

# Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan.

## CONTENTS

Sukeharu NISHIMURA: Über die Reinigung der Amylase aus <i>Aspergillus Oryzae</i> ...	129
Kinsuke KONDO, Tunetomo HAYASHI and Takashi MATSHITA: Studies on Proteins VI...	146
The Influence of Salt on the Point of Optimum Flocculation of Rice-glutelin	
Shigeo SUZUKI and Tetuo MURATA: Studies on the Digestion of Foods. (Part I)...	152
Yusuke SUMIKI: On the Fermentation Products of Glucose by <i>Oidium Laqui</i> ...	153
Yukihiko NAKAMURA: On the Differences of the Brewing Barley according to Species...	155
Konomu MATSUMURA: Quinoline and Acridine Synthesis...	158
Muncai TANAKA: Eine Mikroquantitative Stickstoffanalyse in Boden...	161
Arao ITANO, Satiyo ARAKAWA and Katsumi HOSODA: Investigation on the Biilmann's Quinhydrone Electorode III...	163
Arao ITANO: Studies on the Carbon-Nitrogen Ratio and Microbiological Investigation of the Soil in Rice-Field...	164
Syoko BITO: Studies on the Body-fluid of the Silk-worm...	167

Published by the  
Agricultural Chemical Society of Japan.

C/o Faculty of Agriculture, Tokyo Imperial University

Single Copy (Postage inclusive) :-	¥ 0.35
Annual Subscription (12 numbers) :-	¥ 3.50

## ***The Agricultural Chemical Society of Japan.***

President : Umetarō SUZUKI.

The Council of the Agr. Chem. Soc. of Japan has decided to publish English Abstract of those papers appearing in the Journal in a separate form in order to facilitate the circulation in foreign countries.

Bulletin of the Agr. Chem. Soc. of Japan is published for this purpose from May 1926 monthly. The numbering begins with Vol. 2. No. 5. The earlier parts are represented by the English abstracts published in the Journal annexed to the Japanese texts.

The articles to be appeared in the Bulletin must be concise, supplied with experimental methods and data and understandable, without specially referring to the Japanese texts. It ought, however, not exceed four printed pages as a rule. Any longer articles may be accepted according to the decision of the Council, with or without charge for exceeding pages.

Journal of the Agr. Chem. Soc. of Japan will be published in Japanese as formerly. Those desiring the detailed information of the articles appeared in the Bulletin may look for in the Journal of the same Number or the same Volume.

Editor : Umetarō SUZUKI.

Associate Editors : Kakuji GORŌ and Yoshihiko MATSUYAMA.



# UEBER DIE REINIGUNG DER AMYLASE AUS ASPERGILLUS ORYZAE.

von Sukeharu NISHIMURA.

(Ausgegangen am 15. Sept., 1926)

## EINLEITUNG :

Seit der Entdeckung der Malzamyrase bis auf den heutigen Tag war das Bestreben zahlreicher Forscher darauf gerichtet, viele enzymatisch unwirksame Begleitstoffe durch chemische und physikalische Methoden mehr und mehr zu entfernen, das Enzym in reinerem Zustand zu erhalten und schliesslich es auf seine chemische Natur hin zu untersuchen.

Lange Zeit galt als der gangbarste Weg zur Gewinnung von Malzamyrase in Substanz die Lintner'sche Methode,<sup>1)</sup> nach welcher die enzymhaltigen Malzauszüge im Verhältnis 1 : 2 mit Alkohol gefällt werden. Die beliebte Methode, die bisher hochwertigsten Malzamyrasepräparate zu gewinnen, ist die Sherman und Schlesinger'sche<sup>2)</sup> fraktionierte Fällung mit Alkohol oder Aceton. Sie dialysieren die Enzymlösung bei niedrigen Temperaturen und fällen den Dialysierückstand fraktioniert mit Alkohol. Die zwischen 50 und 65 proz. Alkoholgehalt ausfallende Fraktion hat die kräftigsten enzymatischen Eigenschaften. Sie gelangen auf diesem Wege von dem Fermentativ-Vermögen der Würze  $Fz=1$  gewöhnlich zu Amylasepräparaten vom Fermentativvermögen  $Fz=ca. 30$ . Dieser Wert von  $Fz=30$  wird allerdings nur unter günstigen Umständen erreicht, man kann mit  $Fz=10-15$  schon zufrieden sein. Neuerdings wird auch die Reinigungsmethode mit Hilfe der aufeinanderfolgenden Elektrodialyse und Elektroosmose von Fricke und Kaja<sup>3)</sup> verwendet; diese Forscher erhielten eine Steigerung der enzymatischen Kraft auf den 5 fachen Betrag gegenüber dem Ausgangsmaterial.

Ein jedes bis auf den heutigen Tag dargestellte reinere Malzamyrasepräparat enthält in überwiegender Menge Eiweiss. Fricke und Kaja behaupten eiweissfreie oder wenigstens eiweissarme Lösungen in Händen gehabt zu haben.

In den letzten Jahren ist nun von R. Willstätter<sup>4)</sup> und seinen Schülern ein neues Verfahren der Enzymreinigung ausgebaut worden, das nach seinen Leistungen alle bisherigen Methoden weit übertrifft und bei jenen Enzymen,

1) Lintner: Journ. f. prakt. Chemie (2), 34, 378 (1886).

2) Sherman u. Schlesinger: Journ. Americ. Chem. Soc. 35, 1617 (1913).

3) Fricke und Kaja: Berichte 57, 310; 765 (1924).

4) R. Willstätter: Zeitschr. f. phys. Chem., 123, 45 (1922), siehe auch Liebigs Annalen, 1918 und sf.



bei welchen es systematisch Anwendung fand, wie beim Invertin und der Peroxydase, zu Präparaten von bisher unerreichter und ungeahnter Reinheit führte. Der Grundgedanke dieses Verfahrens ist der, aus der unter Umständen nach einem der älteren Verfahren vorbehandelten Enzymlösung das Enzym mit etlichen Begleitstoffen an ein geeignetes Adsorptionsmittel zu adsorbieren. Ein grosser Teil von Verunreinigungen bleibt dabei in der Lösung. Aus dem Adsorbat wird sodann durch ein geeignetes Lösungsmittel das Enzym herauseluiert, wobei wieder nur ein Teil der Begleitstoffe mit dem Enzym in die Elution übergeht, ein anderer dagegen am Adsorptionsmittel verbleibt. Die Elution kann sodann einer weiteren Adsorption mit dem gleichen oder einem anderen Adsorbens unterworfen werden. Eine folgende Elution liefert dann wieder ein reineres Enzympräparat. Diese Operationen der Adsorption und Elution können unter Umständen vielfach hintereinander wiederholt werden.

In der jüngsten Zeit haben H. Lüers und E. Sellner<sup>5)</sup> diese Reinigungsmethode an der Malzamyase zur Anwendung gebracht und gute Erfolge erzielt. Es gelang ihnen durch Aneinanderreihung von zwei Tonerdeadsorptionen und zwei Elutionen, vom Malzauszug ausgehend, den Reinheitsgrad des Enzyms von  $F_z = \text{ca. } 1$  auf  $F_z = \text{ca. } 25-30$  zu erhöhen. Weiter ausgehend vom Amylasepräparat von  $F_z = \text{ca. } 10$ , das nach der Methode von Sherman und Schlesinger gewonnen war, gelangen sie durch Vornahme zweier Adsorptionen und Elutionen zu  $F_z = \text{ca. } 45-60$ , in seltenen Fällen sogar zu  $F_z = 93$ . Die Analyse ihrer reinsten Präparate ergab einen Proteingehalt von 74% und einen Kohlehydratgehalt von 28.07% der phosphorsalzfreien Substanz. Die Gegenwart von Pentosen, liess sich durch die Furfurolreaktion nachweisen. Also scheint ein bestimmter Eiweisskörper zum Enzym in näherer Beziehung zu stehen.

So einfach im Prinzip dieses Verfahren erscheint, so schwierig ist seine praktische Durchführung; eine Unmenge von Vorarbeiten muss geleistet werden, bis man den richtigen Weg, das geeignete Adsorptions- und Elutionsmittel, die zweckmässigen gegenseitigen Mengenverhältnisse, die günstigsten Bedingungen usw. gefunden hat. Glaubt man sich am Ziel, so zerrinnt nicht selten der Erfolg mühevoller Arbeit in nichts, da die Enzym mit fortschreitendem Reinheitsgrad immer labiler und empfindlicher gegen äussere Einflüsse werden.

Ueber die Enzym von Koji, einem aus *Aspergillus oryzae*, der auf gedämpftem Reis gezüchtet wurde, hergestellten Material, das in Japan schon tausend Jahre hindurch in verschiedenen Gebieten grosse Anwendung findet, besonders über die Enzym der Takadiastase, wie sie in dem von Takamine fabrizierten Präparat vorkommen und wegen ihres Gehaltes an mannigfachen

5) H. Lüers und E. Sellner: Wochenschr. f. Brau. 43. 97 (1925)



abbauenden Enzymen insbesondere ihrer höheren diastatischen Wirkung auch für medizinisch-klinische Zwecke verwendet wird, sind viele frühere Arbeiten vorhanden. In erster Linie war das amylolytische Enzym schon mehrfach Gegenstand eingehender Untersuchung, besonders in den Arbeiten von Atkinson,<sup>6)</sup> Kellner, Mori und Nagaoka,<sup>7)</sup> Stone und Wright,<sup>8)</sup> Saito<sup>9)</sup> und Takamine.<sup>10)</sup> Man verdankt Saito<sup>11)</sup> eine Untersuchung über den Einfluss verschiedener Nährböden auf die Amylasebildung des *Aspergillus oryzae*.

J. Wohlgemuth<sup>12)</sup> untersuchte orientierend die verschiedenen Enzyme der Takadiastase, nämlich die amylolytische, proteolytische (darunter tryptische, labende, ereptische peptolytische) Wirkung und die Lipase, er konnte nur die peptolytische Wirkung nicht nachweisen. Die Verwendung von Stärke als Substrat für die Amylasewirkung haben Sherman und Baker<sup>13)</sup> eingehend besprochen. Auch über die Amylasewirkung haben Sherman und Punnet,<sup>14)</sup> Sherman und Thomas,<sup>15)</sup> Waksman,<sup>16)</sup> Takamine,<sup>17)</sup> über die proteolytische Wirkung Okada,<sup>18)</sup> Szanto,<sup>19)</sup> über die Saccharase Bertrand und Rosenblat,<sup>20)</sup> über die Katalase Neidig,<sup>21)</sup> und noch viele Forscher gearbeitet. Die Resultate aber waren in manchen Punkten widersprechend, entweder fehlten exakte Methoden der enzymatischen Wirksamkeitsbestimmungen, oder es wurden wenig zuverlässige Methoden in Anwendung gebracht.

Neuerdings haben C. Neuberg<sup>22)</sup> und seine Mitarbeiter die verschiedenen Enzyme der Takadiastase untersucht und mit Hilfe der exakten Methoden der neueren Enzymchemie neue darin gefunden und die zur Diskussion gestandenen Probleme klar gestellt.

Ueber die Reinigung der Pilzamyase wurde bisher noch wenig gearbeitet. Die Takadiastase ist gewöhnlich nur ein durch einfache Alkoholfällung des Auszuges von Koji gewonnenes Material, also ein unreines Präparat, welches meistens unter  $F_z = \text{ca. } 2$  hat. Die Takadiastase des Handels kann nach

- 
- 6) Atkinson: Transact. of the Chem. Soc. London (1881).
  - 7) Kellner, Mori und Nagaoka: Ztschr. f. phys. Chem. 14. 197 (1890).
  - 8) Stone und Wright: Journ. Americ. Chem. Soc. 20. 637 (1898).
  - 9) Saito: Centralbl. f. Bakt. (2) 17. Heft 1-7 (1906).
  - 10) Takamine: Journ. soc. chem. Ind. 17. 118 (1898).
  - 11) Saito: Wochenschr. f. Brau. 27. 181 (1910).
  - 12) Wohlgemuth: Biochem. Zeitschr. 39. 324 (1912).
  - 13) Sherman und Baker: Journ. Americ. Chem. Soc. 38. 1885 (1916).
  - 14) Sherman und Punnet: do. 33. 1877 (1916).
  - 15) Sherman und Thomas: do. 41 (1919).
  - 16) Waksman: do. 42 (1920).
  - 17) Takamine: do. 42 (1920).
  - 18) Okada: Biochem. Journ. 10. 130.
  - 19) Szanto: Biochem. Zeitschr. 43. 31.
  - 20) Bertrand und Rosenblat: C. v. d. l'Acad. des Sciences 156. 261.
  - 21) Neidig: Journ. Americ. Chem. Soc. 36 (1914). Ueber die Takadiastase siehe auch Euler, Chemie der Enzyme II. 127.
  - 22) Neuberg und Kurono: Biochem. Zeitschr. 140. 295. (1923) u. sf. Siehe auch Heuss: Tagesztg. f. Brau. 560. (1925)

Sherman und Tauberg<sup>23)</sup> bis auf das 30fache der ursprünglichen Wirksamkeit angereichert werden durch Extraktion mit Wasser, Ausfällen mit Ammoniumsulfat, Dialysieren und fraktionierte Fällung mit Alkohol. Die gereinigten Produkte zeigen noch folgende Proteinreaktion; Millon, Xanthoprotein, Tryptophan-, Biuretreaktion. Charakteristisch für die diastatischen Präparate aus *Aspergillus oryzae* ist das hohe Verhältnis der stärke- verflüssigenden und verzuckernden Fähigkeit.

Ein nach besonderem Verfahren von Takamine dergestellter Extrakt, Polyzime genannt, ist von Takamine und Oshima<sup>24)</sup> studiert worden. Die Verzuckernde Fähigkeit geben diese Forscher folgendermassen an:

	21°	50°
Lintner-Einheiten	43	150
oder als Sf.	1.1	3.9

Die chemische Zusammensetzung ist nach Takamine und Oshima:

Wasser	87.5%	Feste Substanzen	12.5%	Asche	1.5%
--------	-------	------------------	-------	-------	------

Nachdem ich<sup>25)</sup> nun an der Takadiastase die Reinigungsmethode nach Willstätter zur Trennung der verschiedenen in ihr vorkommenden Enzyme ziemlich viel untersucht habe, stellte ich mir die Aufgabe, an der Amylase des Pilzes, nicht von der Takadiastase sondern vom Pilz ausgehend, systematisch den Weg der Adsorptionsreinigung zu gehen, wie er von Willstätter an der Peroxydase und dem Invertin in vorbildlicher Weise gezeigt und geebnet, und von Lüers und Sellner an der Amylase des Malzes verwendet wurde. An den reinsten Präparaten wollte ich dann versuchen, den Fortschritt der Reinigung analytisch-chemisch, insbesondere im Vergleich mit den reinsten Malzamyase-Präparaten festzustellen. Auch sollte dabei beachtet werden, möglichst ohne grosse Verluste an Enzym zum Ziel zu kommen.

#### EXPERIMENTELLER THEIL.

##### I. Allgemeines über die Versuchsmethodik.

Obwohl die Wirksamkeitsbestimmungsbedingungen der Amylase schon in meiner ersten Arbeit erwähnt wurden, müssen sie hier nochmals wiederholt werden, weil eine exakte Bestimmung der enzymatischen Wirksamkeit die Grundbedingung aller Arbeiten besonders auf dem Fermentgebiet ist.

##### BEDINGUNGEN UEBER DIE WIRKSAMKEITSBESTIMMUNG DER AMYLASE.

Die Wirksamkeitsprüfung der Amylase beruht auf der quantitativen Messung der Menge Maltose, welche des Enzym unter genau festgelegten Bedingungen aus seinem spezifischen Substrat, der Stärke, zu bilden vermag.

23) Sherman und Tauberg: Journ. Americ. Chem. Soc. 38. 1638 (1916).

24) Takamine und Oshima: Journ. Americ. Chem. Soc. 42. 1261. (1920)

25) S. Nishimura: Chem. d. Zelle u. Gewebe. 12. 201 (1925).



Als Substrat Verwendete ich zu allen Versuchen lösliche Stärke, die von Kahlbaum bezogen wurde. Bei sämtlichen Amylasewirksamkeitsbestimmungen verwendete ich die Stärkelösungen, 3 prozentig in Bezug auf Stärketrockensubstanz. 3g. Stärketrockensubstanz wurden mit destilliertem Wasser angeschlämmt und die milchähnliche Lösung in ca. 60 ccm, in einem 100 ccm-Kölbchen in lebhaftem Sieden befindliches Wasser eingegossen und darauf noch 3 Minuten weiter gekocht. Das Abkühlen erfolgt unter Verschluss, um eine Hautbildung zu vermeiden.

Zur Festlegung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration der Amylasewirkung setzte ich der Stärkelösung jeweils 6.4 ccm  $\frac{n}{10}$  Essigsäure und 10 ccm  $\frac{n}{10}$  Natriumazetatlösung zu; dieses Puffergemisch entspricht einer  $(H^+) = 1,3 \cdot 10^{-5}$ .

Dieser so vorbereiteten Stärkelösung wurde dann die abgemessene Enzymlösung (meistens 5 ccm) zugesetzt, sofort rasch auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt, umgeschüttelt und die Zeit festgestellt. Die Einwirkung der Amylase auf die Stärke liess man immer bei der konstant gehaltenen Temperatur von 20°C. vor sich gehen.

Nach bestimmter Zeit (immer 30 Min.) entnimmt man dem Reaktionsgemisch Proben von 15 ccm und lässt sie in ein 100 ccm Kölbchen, in dem 30 ccm Fehling'sche Lösung sich befinden, einfließen, wodurch augenblicklich die Vernichtung des Enzyms erfolgt. Die Menge der gebildeten Maltose wurde auf massanalytischem Wege nach Kjeldahl-Bertrand bestimmt. Das Reduktionsvermögen der Stärke- und der Enzymlösung wurde in einem blinden Versuche ermittelt und in Abzug gebracht.

Das zu prüfende Enzymmaterial war meist schon in Lösung vorhanden. In diesem Falle brauchte dann nur noch eine Trockensubstanzbestimmung durch Trocknen eines gemessenen Volumens im Vakuum vorgenommen zu werden.

#### BERECHNUNG DES VERZUCKERUNGSVERMÖGENS DES AMYLASEPRÄPARATES.

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante K, die als Mass für die Intensität des Abbaues angesehen werden kann, ergibt sich aus der Gleichung.<sup>26)</sup>

$$K = \frac{1}{t \cdot 0.4343} \cdot \log \frac{a}{a-x}$$

dabei ist

t ... .. die Wirkungszeit (30 Min.)

x ... .. die Maltosemenge, welche nach der Zeit t gebildet wird.

a ... .. spaltbare Substanzmenge oder Anfangskonzentration.

Da der Grenzabbau der Stärke bei 75% Maltose liegt, wird  $a = 3 \cdot 0.75 = 2.25$  in Rechnung gesetzt.

26) Lüers und Sellner, loc. cit.

Mit Hilfe dieses K-Wertes lässt sich dann das Verzuckerungs-vermögen des Amylasepräparates Fz folgendermassen ausdrücken :

$$Fz = \frac{K \cdot g \text{ Stärke}}{g \text{ Trockensubstanz des Enzympräparates}}$$

Diese Fz-Werte sind miteinander vergleichbar. Steigt Fz im Verlaufe einer Operation, die man mit dem Enzyme vornimmt, an, so heisst das, das Enzym hat an Wirksamkeit zugenommen, die Trockensubstanz ist an Enzym reicher, an Begleitstoffen ärmer geworden. Die Fz=Werte setzen uns also in den Stand, über den Erfolg der vorgenommenen Enzymreinigungsmethoden quantitative Schlüsse zu ziehen.

#### TROCKENSUBSTANZBESTIMMUNG IN DEN PHOSPHATELUTIONEN.

Die Phosphatlösung hat sich unter den bisher untersuchten Elutionsmitteln am besten bewährt. Aber ein Nachteil davon ist der, dass die Trockensubstanz der Elutionen grosse Phosphatmengen enthält, die eine exakte Trockensubstanzermittlung, wie sie für die Fz-Berechnungen nötig sind, sehr erschweren. Es geht auch nicht an, einfach die berechnete Phosphatmenge, unter Berücksichtigung des Kristallwasserverlustes beim Trocknen vom ermittelten Trockensubstanzgewicht zu subtrahieren, denn ein Teil des Phosphates bleibt an der Tonerde haften. Deshalb wird die gewogene Trockensubstanzmenge nach Lösen in Salpetersäure nach von Lorenz quantitativ auf Phosphorsäure untersucht.

Aus dem  $P_2O_5$ -Gehalt lässt sich dann die Menge des Phosphatgemisches von Ph=8.0, die bei meinen Versuchen immer verwendet wurde und aus 9.4 ccm  $\frac{m}{15} Na_2HPO_4 + 0.6$  ccm  $\frac{m}{15} KH_2PO_4$  besteht, nach folgendem Ansatz berechnen :

$$\begin{array}{rcll} 9.4 \text{ mol.} & + & 0.6 \text{ mol.} & \text{entsprechen} & 5 \text{ mol.} \\ Na_2HPO_4 & & KH_2PO_4 & & P_2O_5 \\ (\text{wasserfrei}) & & & & \\ = 1335.67 \text{ g.} & + & 81.684 \text{ g} & & \\ = & & 1416.88 \text{ g} & & = 710.4 \text{ g} \end{array}$$

Die durch die Analyse ermittelte  $P_2O_5$ -Menge, multipliziert mit  $\frac{1416.88}{710.4} = 1.994$  liefert die von der Trockensubstanz zu subtrahierende Phosphatmenge.

#### II. Gewinnung der Amylase.

Zuerst wurde geprüft, auf welchem Nährboden der Pilz am besten die Amylase zu bilden vermag, um damit ein gutes Ausgangsmaterial des Enzyms zu bekommen. Als Nährmaterialien wurden Würze, Reiskleister, Reis-Weizenkleiekleister, gedämpfter Reis, gedämpfte Weizenkleie folgendermassen geprüft ;

1. 8%ige Würze. Auf die Würze, die in grossen Glasschalen sich befand und sterilisiert war, wurden die Sporen des Pilzes, die in der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München aufbewahrt waren und auf Würzegelatinplatte



gezüchtet wurden, ausgesät und bei ca. 30°C. im Thermostat aufbewahrt. Nach 4–5 Tagen wurde das Myzel, das auf der Würze sich als weisser Rasen entwickelte, aus der Würze herausgenommen, mit wenig Wasser gewaschen, dann bei ca. 40°C. im Faust-Heim-Trockenapparat getrocknet und pulversiert.

Eine bestimmte Menge des Präparates wurde mit Wasser ohne oder unter Zusatz von Toluol mit Sand zerrieben und das Filtrat, wie schon erwähnt, auf 3%iger gepufferter Stärkelösung einwirken gelassen. Der nach 30 Min. bei 20°C. gebildete Zucker wurde bestimmt.

2. 10–20% Reis wird mit Wasser zu Kleister verkocht, in die Glasschale hineingegossen, darauf werden die Sporen ausgesät. Weiter wurde wie bei 1) verfahren.

3. 20% Reis und Weizenkleiegemisch wurde mit Wasser zu Kleister verkocht und weiter wie oben behandelt.

4. Auf gedämpftem Reis entwickeltes Myzel wurde mit dem Reis zusammen mit Wasser und Sand zerrieben und klar filtriert.

5. In gedämpfter Weizenkleie entwickeltes Myzel wurde, wie später eingehend erwähnt wird, behandelt.

Als Beispiel von mehreren Versuchen sei Folgendes angeführt.

	15 ccm Verzuckerungsgemisch verbrauchten Permanganat nach 30%. (ccm)	Trockensubstanz (in 5 ccm)
1	4.1	0.2 g.
2	5.7	0.2 g.
3	8.2	0.2 g.
4	5.8	0.244 g.
5	13.8	0.0925g.

Also wie Saito<sup>27)</sup> und Takamine<sup>28)</sup> berichtet haben, wird die Amylase am meisten beim Wachstum auf gedämpfter Weizenkleie gebildet. Infolgedessen wurde, um die Amylase zu gewinnen, zu den weiteren Versuchen stets Weizenkleie als Nährmaterial verwendet.

Je 100g. Handels-Weizen-Kleie werden mit ca. 70 ccm Wasser befeuchtet, in einen Sack gebracht und in einem Topf eine Stunde gedämpft. Nachdem die Masse in der Glasschale sich abgekühlt hatte, wurde sie mit Pilzsporen gut geimpft und bei ca. 30°C. im Thermostat 3–4 Tage gehalten, bis das weisse Myzel gut wächst. Die ganze Menge wird mit Sand und wenig Wasser zerrieben, weiter ca. 800 ccm Wasser zugegeben, umgerührt und nach 1 Stunde durch Faltenfilter filtriert. Man erhält eine trübe Lösung. Um diese Trübung zu beseitigen, wird eine ziemlich grosse Menge Kieselguhr in die Lösung gegeben, gut gemischt und dann durch eine Nutsche klar filtriert.

27) Saito: Wochenschr. für Brau. 27. 181 (1910).

28) Takamine: Journ. Ind. und Engin. Chem. 6. 824 (1914).

Dabei adsorbiert die Kieselguhr keine Amylase. Es wird dadurch ca. 650—700 ccm klarer Auszug gewonnen, der im Eisschrank zur Untersuchung aufbewahrt wird. Wegen des leichten Wachsens fremder Bakterien sind die Auszüge nur kurze Zeit haltbar, deshalb muss man öfter mit Kieselguhr filtrieren. Die Untersuchungen werden dadurch erschwert, dass die Beschaffenheit der Auszüge mehr oder weniger sich verändert, obwohl die Amylase-wirksamkeit sich wenig vermindert.

Das Verzuckerungsvermögen Fz der Auszüge schwankt zwischen 0.2—0.4, ihr PH war ca. 6—5.5. Es ist also das Verzuckerungsvermögen der Auszüge kleiner als das des Malzes, das gewöhnlich  $Fz=1$  ist:

Als Beispiel:

angew. ccm der Auszüge	g Maltose nach 30 Min.	Tr. Sub. in 5 ccm.	Fz.
5	0.7366	0.0742	0.38
5	0.6813	0.0961	0.28
5	0.5767	0.0684	0.33
5	0.4180	0.0788	0.193
5	0.7207	0.1260	0.23

Um weiter zu prüfen, ob mit anderen Lösungen als Wasser die Amylase noch besser herausgelöst werden kann, wurden folgende Versuche angesetzt:

10g. Kleiematerial, in dem der Pilz sich kräftig entwickelt hatte, wurden mit 100 ccm verschiedener Lösungen extrahiert und mit Kieselguhr klar filtriert. Zur Bestimmung des Verzuckerungsvermögens wurden 5 ccm davon verwendet.

	15 ccm Verzuckerungs- gemisch verbrauchten Permanganats nach 30 Min.	Tr. Subs. in 10 ccm.
1. 20%ige Alkohollösung, 1 Std.	13.4 ccm	0.126 g.
2. 10%ige Kochsalzlösung, 1 Std.	12.7 ccm	—
3. Mit Aether und Sand zerrieben, nach dem Vertreiben von Aether mit 100 ccm Wasser digeriert, 1 Std.	14.0 ccm	0.137 g.
4. Mit Sand und Wasser, wie oben geschrieben, 1 Std.	13.5 ccm	0.122 g.
5. do., 3 Stdn.	13.8 ccm	0.127 g.

Die Unterschiede sind nicht gross, doch zeigt sich, dass wenn die Amylase mehr herausgelöst wird, die Menge der Trockensubstanz auch steigt. Deshalb wurde zum Extrahieren immer nur Wasser verwendet.

### III. Vorreinigungsversuche.

Kaolin und Kieselguhr können in dem Auszug von PH ca. 6 die Amylase nicht adsorbieren. Wenn sie aber andere Substanzen adsorbieren können, so kann man damit den Auszug vorreinigen. Um dies zu prüfen, wurden folgende Versuche angesetzt.

0.5 Kaolin oder Kieselguhr wurden in 10 ccm Auszug gegeben und gut gemischt. Nach den Zentrifugieren wurden 5 ccm des Filtrats vom Adsorbat getrocknet und gewogen.



5 ccm Auszug enthielten 0.100g. Trockensubstanz.

5 ccm der Filtrate enthielten 0.097—0.099g. Tr. Sub.

Also wird die Trockensubstanz auch durch diese Voradsorption fast nicht vermindert. Wenn man den Auszug mit NaOH oder HCl versetzt bis schwache Trübung auftritt, dann wird wohl die Trockensubstanz vermindert, jedoch wird auch ein Teil der Amylase vernichtet.

Wenn kleine Mengen Tonerde wenig Amylase, aber verhältnismässig mehr andere Substanz adsorbieren dann könnte man damit den Auszug vorreinigen. Um dies zu prüfen, wurde 1 ccm bzw. 2 ccm Tonerde-Sol mit 10 ccm Auszug versetzt. Nach dem Zentrifugieren wurden Trockensubstanz und Verzuckerungskraft der Filtrate in je 5 ccm bestimmt.

	angew. ccm	Tr. Subst. in 5 ccm	15 ccm Verzuckerungsgemisch verbrauchten Permanganats nach 30'.
Auszug	5	0.0925 g.	14.2 ccm
mit 1 ccm Tonerde	5	0.0918 g.	13.4 ccm
mit 2 ccm Tonerde	5	0.0873 g.	11.0 ccm

Je mehr also Trockensubstanz durch Tonerde adsorbiert wird, desto mehr wird auch das Enzymmaterial adsorbiert. Mit so kleinen Mengen Tonerde, welche das Enzym nicht mehr adsorbieren, ist keine Entfernung nennenswerter Mengen Trockensubstanz möglich. Man kann also weder mit Tonerde noch mit Kaolin und Kieselguhr, wie diese Versuche zeigen, den Auszug vorreinigen.

#### IV. Reinigungsversuche.

##### a) Versuche durch Tonerdeadsorption.

Nach den bisherigen Erfahrungen, die über die Adsorptionsreinigung von Amylase vorliegen, hat sich als Adsorptionsmittel kolloide Tonerde, als Elutionsmittel die Phosphatlösung ausgezeichnet bewährt. Deshalb beschränkte auch ich mich bei den folgenden Versuche auf Tonerde und Phosphat.

Die Darstellung der kolloiden Tonerde und die Arbeitsmethoden der Adsorption und Elution sind schon in meiner ersten Arbeit<sup>29)</sup> genau angegeben. Durch die auswählende Adsorption blieben tote Begleitstoffe des Enzyms in der Ausgangslösung zurück, durch die selektive Elution ging das Enzym wiederum reiner vom Adsorbat in die Lösung über. Die Reinigungswirkung suchte ich dadurch zu verstärken, dass ich mehrere solcher Adsorptionen und Elutionen aufeinanderfolgen liess. 100 ccm der Tonerdesuspension, die stets hierbei verwendet wurde, enthielten 0.955g.  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

In mehreren Versuchen, von einer Ausgangsflüssigkeit von  $F_z=0.2-0.4$  ausgehend, gelang es durch einmalige Adsorption und Elution zu  $F_z=\text{ca. } 2-3$ , durch zweimalige Adsorption und Elution zu  $F_z=\text{ca. } 5-6$  zu kommen.

29) Nishimura: loc. cit.

Während die erste Elution schwach gelblich gefärbt war, erschien die zweite durchwegs als völlig farblos. Durch dreimalige Adsorption und Elution nur mit Tonerde und Phosphat konnte der Wert nicht bedeutend gesteigert werden.

Man kann den Auszug fast ohne Verlust von Amylasewirksamkeit im Vakuum konzentrieren. 300 ccm Auszug wurden im Claisenkolben, wie bei der Vakuumdestillation, unter Minderdruck von 13—14 mm. bei 40—45°C. ca. in 2 Stunden ungefähr zur Hälfte eingengt.

	angew. ccm	15 ccm Verzuckerungsgemisch verbrauchten Permanganats.
Ausgangsauszug	5	10.8
Konz. Auszug	5	20.8
	Tr. Subst. in 5 ccm.	
Ausgangsauszug		0.064 g.
Konz. Auszug		0.132 g.

Das Eindampfen hat also die Amylase nicht geschädigt. Die Adsorptionen und Elutionen an diesen konzentrierten Auszügen sind etwas besser als am Ausgangsauszug gegangen:

Es gelang durch die einmalige Reinigung zu  $Fz = ca. 3-5$ , durch die zweimalige Reinigung zu  $Fz = ca. 7-9$  zu kommen.

Als Beispiel diene folgender Versuch:

20 ccm Auszug wurde mit 20 ccm Tonerdesuspension (100 ccm enthielten 0.955 g.  $Al_2O_3$ ) versetzt, nach 1/4 Stunde zentrifugiert, das Adsorbat einmal mit 40 ccm Wasser in der Zentrifuge gewaschen, dann mit 12 ccm Phosphatgemisch + 8 ccm Wasser von  $pH = 8.0$  1/2 Stunde lang unter Eiskühlung und Turbinierung eluiert. 20 ccm der Elution wurden mit 10 ccm Tonerdesuspension, welche 4.8 ccm  $\frac{n}{10}$  HCl zwecks Einstellung des Gemisches auf  $pH = 5.0$  enthielt, zum zweitenmal adsorbiert und nach der gleichen Behandlung, wie bei der ersten Adsorption mit 4 ccm Phosphatgemisch + 16 ccm Wasser in gleicher Weise eluiert. Eine grosse Menge Auszug wird auf diese Weise in kleinen Portionen gereinigt.

Nachstehend die Belege:

Enzymmaterial.	angew. ccm	g Maltose in 100 ccm nach 30 Min.	K	g Tr. Sub. in 100 ccm Enzymlösg.	Fz.
Auszug	5	0.836	0.01546	3.640	0.1911
Filtrat von Adsorbat	5	—			
1. Elution	5	0.710	0.01264	0.1275	4.46
2. Elution	5	0.555	0.009448	0.0514	8.27

Das Adsorptionsvermögen des Al-Hydroxydes hängt im wesentlichen von seiner Darstellungsweise ab. Veranlasst durch diese Tatsache haben in neuester Zeit R. Willstätter und H. Kraut<sup>30)</sup> eingehende Untersuchungen hierüber angestellt.

30) Willstätter und Kraut: Berichte 56. 149. 1117. (1923).



Wie früher schon erwähnt wurde und folgende Zahlen auch beweisen, zeigt sich bezüglich des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration auf die Adsorption des Enzyms an Tonerde, dass schwach-saure Reaktion von  $\text{pH}$  etwa 5 sie am meisten begünstigt. Neutrale oder schwach alkalische Reaktion setzt sie dagegen bedeutend herab.

Material:	angew. ccm	Zusatz.	adsorbiert bei $\text{pH}$	g Maltose nach 30%.
Filtrat von Adsorbat	5	0	5.8	0.0375
	5	1 ccm $\frac{n}{10}$ HCl	5.0	0.0331
	5	1 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH	8.0	0.0705

Der vorwiegend saure Komplex Enzym-Begleitstoffe wird also von der basischen Tonerdesuspension sehr gut adsorbiert. Stumpft man die Acidität ab, so verringert man den elektronegativen Charakter des Enzymkomplexes, was Verminderung der Adsorption an die positive Tonerde zur Folge hat.

Für die Reinigung des Enzyms von Begleitstoffen ist die Selektivität der Adsorption von grosser Bedeutung. Man will möglichst viel vom Enzym und möglichst wenig von unerwünschten Begleitstoffen im Adsorbat vorhanden haben. Deshalb muss man die Mengenverhältnisse so wählen, dass mit möglichst wenig Tonerde möglichst viel Enzym adsorbiert und mit möglichst wenig Phosphatgemisch möglichst viel Enzym eluiert werden.

Sämtliche Versuche sind selbstverständlich immer unter Eiskühlung vorgenommen. Um die Verzuckerungskräfte leicht vergleichen zu können, wurden alle Elutionsvolumina gleich gross wie die Anfangsvolumina gewählt.

#### b) Versuche durch Fällung des Enzyms mittels Aceton.

Die fraktionierte Fällung des Enzyms nach der Methode von Sherman und Schlesinger erfolgte hierbei mit Aceton ohne vorangehende Dialyse. Um richtige Mengenverhältnis zu bekommen, wurden folgende Versuche durchgeführt.

Gemessene Mengen Aceton und Auszüge werden vermisch (immer unter Eiskühlung), zentrifugiert und zur auszentrifugierten Lösung wieder eine bestimmte Menge Aceton zugegeben und neuerdings zentrifugiert. Die beiden Niederschläge wurden mit Aceton und Aether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Diese Präparate wurden zur Verzuckerungsbestimmung verwendet.

Das Mengenverhältnis Aceton: Auszug hängt von der Konzentration des Auszuges ab. Je mehr die Konzentration zunimmt, desto weniger muss man Aceton zugeben.

Folgende Tabelle zeigt als Beispiel das Ergebnis:

	20 ccm Auszüge		1. Zugabe		2. Zugabe			
	Tr. Sub. g.	g. Maltose nach 30%.	Aceton menge ccm.	g. Maltose nach 30%.	Acetonmenge ccm	g. Maltose nach 30%.	Tr. Sub. g.	Fz.
1.	0.315	1.661	20	0.4393				
2.	0.936	6.587	20	1.4187				

3.	1.416	11.774	15	0.5226 {	15	4.909	0.0940	1.87
					10	3.856	0.0543	2.59
				1.2853 {	15	7.894	0.1487	2.19
					10	7.520	0.1108	2.76
			10	0.6707				

Es werden also unerwünschte Begleitstoffe zusammen mit wenig Enzym durch den Zusatz von ca. 70 Vol. % Aceton, bezogen auf die Ausgangslösung, beseitigt und der den Hauptteil an Amylase enthaltende Niederschlag wird durch neuerlichen Zusatz von Aceton in einer Menge von 50 Vol. % der Ausgangslösung gewonnen, wodurch man Präparate von  $Fz=ca. 2-4$  erhalten kann. Nachdem die günstigen Mengenverhältnisse kennen gelernt waren, wurde der Auszug (2) in der Tabelle mit 70 Vol. % Aceton (z. B. auf 100 ccm 70 ccm Aceton) versetzt, wobei man durch Eiskühlung immer für niedrige Temperaturen sorgte. Die Fällung wurde in ca. 300 ccm fassender Zentrifuge so rasch als möglich in einigen Portionen abgeschleudert. Die Acetonlösung wurde jetzt weiterhin mit 50 Vol. % Aceton (bezogen auf das Volumen der Ausgangslösung) versetzt und der Hauptteil an Amylase rasch abzentrifugiert. Nach raschem Trocknen mit Aceton und Aether wurde das fast weisse Präparat über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuum aufbewahrt. Je rascher man mit den einzelnen Operationen verfährt, desto hochwertiger werden die Präparate. Die Ausbeute betrug ca. 2g. Trockenpräparat von  $Fz=2.56$  aus 200g. Weizenkleiematerial und Ausgangsauszug von  $Fz=0.3$ .

Mit diesen Trockenpräparaten setzte ich nun die Adsorptions- und Elutionsversuche fort, wie oben schon geschildert wurde. Aus mehreren durchgeführten Versuchen, wobei  $Fz=ca. 9-11$  und  $15-17$  erreicht wurde, möge wieder hier ein Beispiel mitgeteilt sein.

0.1g. Enzympräparat wurde nach Verreiben mit Glasmehl mit insgesamt 50 ccm Wasser in Lösung gebracht. Diese Lösung versetzte man mit 15 ccm Tonerdesuspension, liess unter Rühren 1/4 Stunde die Adsorption vor sich gehen, zentrifugierte das Adsorbat ab und eluierte nach einmaligem Waschen 1/2 Stund lang mit 10 ccm Phosphatlösung + 40 ccm Wasser unter Eiskühlung. 50 ccm der Elution wurden mit 10 ccm Tonerdesuspension, die mit 4.5 ccm  $\frac{n}{10}$  HCl angesäuert wurde, zum zweitenmal adsorbiert und das gewaschene Adsorbat mit 10 ccm Phosphatlösung + 40 ccm Wasser wieder eluiert. Auf diesem wege wurde portionsweise die zur Trockensubstanzbestimmung genügende Menge Elution gewonnen.

Es folgen die Belege :

Enzymmaterial	angew. ccm	g. Maltose nach 30%.	K	g. Tr. Sub. in 100 ccm	Fz
Enzymlösung 0.2%	5	0.6880	0.01136	0.2	2.56
Filtrat vom 1. Adsorbat	5	—			
1. Elution	5	0.5597	0.00954	0.04103	10.75
2. Elution	5	0.4813	0.00802	0.02088	16.36



Es ist noch zu erwähnen, dass bei der fraktionierten Acetonfällung ziemlich bedeutende Mengen Enzym verloren gehen dadurch, dass viel vom Präparat in den Zentrifugiergläsern an den Wandungen hängen bleibt, das schwer herauszubekommen ist, insbesondere wenn die Arbeit nicht rasch durchgeführt wird, wodurch unvermeidliche grössere Aktivitätsverluste eintreten, besonders im Vergleich mit der Adsorptionsmethode.

Beispiel :

Material:	g. Tr. Sub.	g. Maltose nach 30'.	Fz
20 ccm Auszug	0.9360	6.587	0.3
Acetonfällung	0.0543	3.856	2.58
zum Vergleich, Einmalige Adsorp und Elution	0.0687	5.698	3.22

### c) Versuche mit Bleiacetatfällung.

Die Amylase wird durch Bleiacetat aus dem Auszug mit Eiweissstoffen zusammen vollständig ausgefällt und aus dem Niederschlag mit schwach alkalischen Lösungen wieder eluiert.

Aus mehreren Versuchen sei ein Beispiel gegeben: 20 ccm Auszug wurden mit 4 ccm gesättigter klarer neutraler Bleiacetatlösung gemischt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit Wasser einmal gewaschen und mit schwach alkalischen Lösungen in Eiskühlung eluiert.

Auszug	Elutionslösung.	angew. ccm	g. Maltose nach 30'.	g. Tr. Sub. in 100 ccm.	Fz.
20 ccm		5	0.639	1.694	0.297
Filtrat.		5	—		
	0.5 ccm $\frac{n}{5}$ $\text{NH}_3$ + 19.5 ccm Wasser	5	0.255		
	1.0 ccm " + 19.0 ccm "	5	0.296	0.0584	3.62
	1.5 ccm " + 18.5 ccm "	5	0.245		
	1.0 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH + 19.0 ccm "	5	0.311		
	1.5 ccm " + 18.5 ccm "	5	0.377	0.0872	3.16
	2.0 ccm " + 18.0 ccm "	5	0.281		
	1 ccm Phosph. + 19 ccm "	5	0.361		
	2 ccm " + 18 ccm "	5	0.475	0.1166	3.05
	3 ccm " + 17 ccm "	5	0.517	0.1358	2.88

Man kann also durch Bleiacetatfällung und darauf folgende Elution ziemlich den gleichen Fz=Wert wie bei der einmaligen Tonerdeadsorption, erreichen, aber besonders bei der Elution mit  $\text{NH}_3$  oder NaOH tritt ziemlich grosser Verlust der Enzymmenge ein. Die Elution mit  $\text{NH}_3$  oder NaOH hängt wesentlich vom Zustand der Flockenbildung mit Bleiacetat ab, denn je feiner die Flocken sind, desto besser waren die Elutionen.

Durch die Phosphatlösung kann man eine grössere Enzymmenge eluieren, jedoch treten dabei immer schwach kolloide Trübungen auf, besonders wenn man eine grössere Menge Phosphat verwendet.

### d) Adsorption mit Tonerde und Bleiacetat.

Durch alleinige Aneinanderreihung der Tonerde und Phosphatlösung kann

man nicht über gewisse Wirksamkeiten hinausgelangen und zwar ist die Grenze schon bei dreimaliger Elution erreicht. Sie müssen deshalb mit anderen Adsorptions- oder Elutionsmitteln kombiniert werden. Bleiacetat bildet in der Phosphatlösung kolloides Bleiphosphat, wodurch es möglich ist, noch Begleitstoffe zu beseitigen. Kolloides Bleiphosphat adsorbiert auch auf saurer Seite und dabei wird die Amylase auch adsorbiert. Deshalb müssen die Mengenverhältnisse genau bestimmt werden. Zu den folgenden Versuchen wurde basische Bleiacetatlösung genommen, und zwar eine gesättigte klare Lösung.

Beispiel :

In 20 ccm 1. Elution zugegebene	angew. ccm	g. Maltose nach 30'	PH
Bleiacetatsmenge	5 ccm Elution	0.7093	8.0
1.4	5	0.6074	6.4
1.6	5	0.5120	6.2

Aus zahlreichen Versuchen wird ein günstiges Mengenverhältnis als Beispiel hier gezeigt :

30 ccm Auszug wurden mit 30 ccm Tonerdesuspension versetzt, nach 1/4 Stunde zentrifugiert, das Adsorbat einmal gewaschen, dann mit 18 ccm Phosphatgemisch + 12 ccm Wasser 1/2 Stunde lang unter Eiskühlung und Turbinierung eluiert. 30 ccm der Elution wurden mit 2 ccm gesättigter klarer basischer Bleiacetatlösung versetzt und gut umgerührt und nach 1/4 Stunde zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit 6 ccm Tonerdesuspension, welcher 1.2 ccm  $\frac{n}{10}$  HCl zugegeben wurde, zum zweitenmal adsorbiert und nach der gleichen Behandlung mit 6 ccm Phosphatgemisch + 24 ccm Wasser in gleicher Weise eluiert. 30 ccm der zweiten Elution wurden mit 0.9 ccm Bleiacetatlösung versetzt und weiter in gleicher Weise behandelt. Das Filtrat wurde mit 3 ccm Tonerdesuspension unter Zusatz von 1.2 ccm  $\frac{n}{10}$  HCl zum drittenmal adsorbiert und nach der gleichen Behandlung mit 3 ccm Phosphatgemisch + 27 ccm Wasser wiederum eluiert. Je mehr die Reinigung zunimmt, desto schärfer muss man die Elution zentrifugieren, um ganz klare Elution zu gewinnen.

Es folgen die Zahlenbelege :

Material.	angew. ccm	g. Maltose nach 30'	K	g. Tr. Sub. in 100 ccm Enzymlösg.	Fz.
Auszug	5	0.836	0.01546	3.640	0.1911
1. Elution	5	0.710	0.01264	0.1275	4.46
2. Elution	5	0.4912	0.008189	0.02596	14.25
3. Elution	5	0.372	0.006025	0.01120	24.16

Der Erfolg der einmaligen Elution und darauf folgender zwei aneinandergereihter Adsorptionen und Elutionen mit Tonerde, Bleiacetat und Phosphatgemisch war nun folgender :

Die zweite Adsorption und Elution führte von den Auszügen mit einem  $Fz=0.2-0.4$  zu einem  $Fz=ca. 13-15$ . Die dritte Adsorption und Elution



erhöhte das Verzuckerungsvermögen auf  $F_z = \text{ca. } 23-26$ , was unter diesen durchgeführten sämtlichen Versuchen der höchste Wert war.

Was bereits bei den Vorversuchen wichtig war, musste in gleicher Weise auch bei den zweiten und dritten Adsorptionen und Elutionen neuerlich geprüft werden. Insbesondere waren jeweils die günstigen Mengenverhältnisse von Adsorbens und Sorbendum neu zu ermitteln.

#### V. Analyse des Reinpräparates.

Nachdem man zu einem nicht leicht zu übertreffenden Höchstwert gelangt war, musste man, um die gereinigten Präparate zu analysieren, grosse Mengen Auszug auf die gleiche Art portionsweise reinigen und im Vakuum eindampfen. Man erhielt so insgesamt eine Menge Trockensubstanz von 1.1906 g. Sie wurde mit heissem Wasser aus der Platinschale quantitativ herausgenommen und auf 50 ccm aufgefüllt. Von der gut durchgeschüttelten Lösung wurden mit der Pipette gemessen Teile entnommen und folgende Bestimmungen durchgeführt.

Um die phosphatfreie Trockensubstanz zu bestimmen, wurde ein Teil davon zur Phosphorbestimmung gebracht. Es enthielt 1 ccm der Lösung 0.002693g. phosphatfreie Trockensubstanz.

Um den Kohlehydratgehalt zu bestimmen, wurden 20 ccm davon mit 4 ccm HCl von sp. Gew. 1.125 und ca. 20 ccm Wasser 3 Stunden lang im kochenden Wasserbad unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde neutralisiert, auf 100 ccm aufgefüllt und die Zuckerbestimmungen ausgeführt. Der Kohlehydratgehalt wurde aus dem Dextrosewert nach Inversion und Multiplikation mit 0.9 berechnet.

Der Stickstoff wurde nach der Mikrokjeldahlmethode<sup>31</sup> bestimmt.

Das Ergebnis war folgendes:

Proteingehalt:	im Präparat von $F_z = 2.5$	35.13%
	im Präparat von $F_z = 25.5$	69.89%
Kohlehydratgehalt:	im Präparat von $F_z = 2.5$	46.82%
	im Präparat von $F_z = 25.5$	26.94%

Färbungsreaktionen des Präparates: Xanthoprotein R., Millonsche R., Biuret R., Liebermann'sche R. und Adam-Kiewicz'sche R. sind alle sehr deutlich eingetreten.

Durch den Reinigungsvorgang fand also eine erhebliche Anreicherung der Stickstoffsubstanzen und eine dementsprechende Verarmung an Kohlehydraten statt.

Zum Vergleich bringe ich die Analysenwerte, welche Lüers und Sellner an ihren reinsten Malzamyasepräparaten fanden:

31) F. Pregl: Die quantitative organische Mikroanalyse. 113.

	Nishimura Asperg. oryzae	Lüers u. Sellner Malzamyase
Proteingehalt	69.89%	74.4%
Kohlehydratgehalt	26.94%	28.07%

Die Werte liegen ziemlich nahe beieinander.

Dieses energische Zusammenhalten des Komplexes Eiweiss-Enzym ist bemerkenswert. Es kann aber zur Zeit nicht gesagt werden, dass die Amylase selbst ein Eiweisskörper sei, eine endgültige Behauptung nach dieser Richtung wird erst zu fällen sein, wenn weitere Reinigungsversuche, die zu bedeutend aktiveren Präparaten führen müssen, vorliegen werden. Dass aber das Enzym auch in *Aspergillus oryzae* in naher Beziehung zu Eiweisskörpern steht, beweisen diese Versuche ebenso wie jene an der Malzamyase von Lüers und Sellner.

#### Zusammenfassung :

Die von R. Willstätter und seinen Mitarbeitern ausgearbeiteten und von H. Lüers und E. Sellner zur Reinigung der Malzamyase verwendeten Methoden der Adsorption und Elution besonders mit Tonerdesuspensionen und Phosphatgemischen sind auch zur Reinigung der Amylase aus *Aspergillus oryzae* gut brauchbar. Das kolloide Aluminiumhydroxyd nimmt aus schwach saurer Lösung das Enzym vollständig auf. Aus diesem Adsorptionsverhalten geht der amphotere Charakter des Komplexes, den die Amylase mit Begleitstoffen von Eiweissnatur bildet, hervor. Aus dem Tonerdeadsorbat lässt sich das Enzym in reinerem Zustand mit sehr schwach alkalischer Phosphatlösung von  $\text{pH}=8.0$  eluieren. Durch Aneinanderreihung von zwei Tonerdeadsorptionen und zwei Elutionen gelingt es, vom Auszug von  $\text{Fz}=\text{ca. } 0.2-0.4$  ausgehend, den Reinheitsgrad des Enzyms auf  $\text{Fz}=\text{ca. } 3-5$  bzw.  $7-9$  zu steigern. Eine dritte Adsorption und Elution gelang in keinem Fall. Eine weitere Steigerung des Reinheitsgrades lässt sich dagegen erzielen, wenn man von trockenen durch Acetonfüllung erhaltenen Präparaten mit bereits höherem Wirkungswert ausgeht. Durch zwei Reinigungen gelang es, vom Trockenpräparat von  $\text{Fz}=\text{ca. } 2-4$  ausgehend, die Wirksamkeit auf  $\text{Fz}=\text{ca. } 9-11$  bzw.  $15-17$  zu steigern. Die Methode hat aber den Nachteil, dass sie ziemlich grosse Verluste des Enzyms bedingt und trotz weiterer Verfolgung keinen höheren Wert mehr erreichen lässt.

Auch Aneinanderreihung von zwei Tonerdeadsorptionen und zwei Elutionen führt nicht wesentlich weiter. Durch Kombination von Tonerde und Bleiphosphatadsorptionen und Phosphatelutionen gelang die bisher höchste Wirksamkeitssteigerung und zwar, vom Auszug von  $\text{Fz}=\text{ca. } 0.2-0.4$  ausgehend, durch zweimalige Reinigung auf  $\text{Fz}=\text{ca. } 13-15$  und weiter durch eine dritte Reinigung auf  $\text{Fz}=\text{ca. } 23-26$ . Wenn man von noch hochwertigeren Auszügen

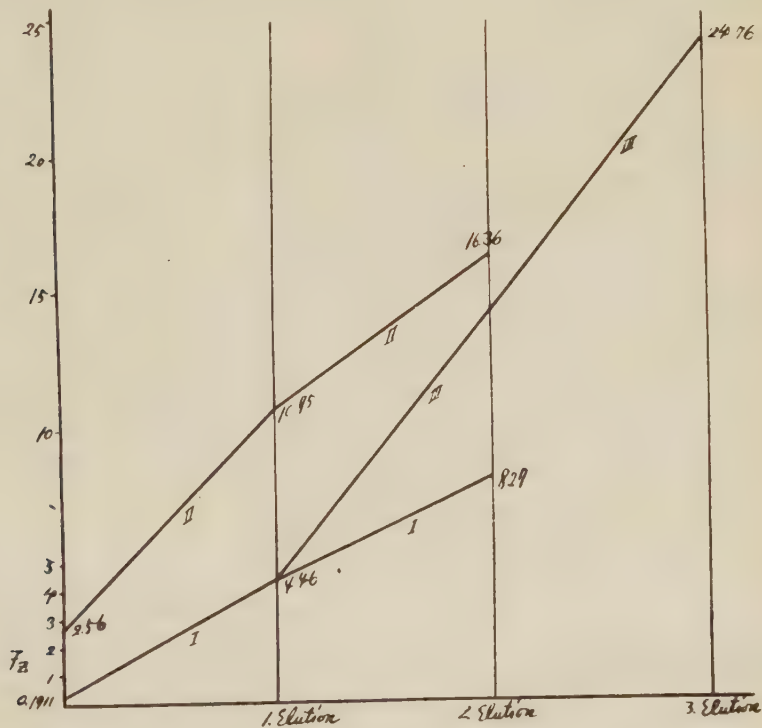


ausgehen könnte, könnte man sicher noch höhere Wirksamkeitssteigerung erreichen, obwohl Anfangskonzentration und Wirksamkeitssteigerung nicht parallel gehen.

Die Wirksamkeitssteigerungen werden hier nochmals anschaulich zusammengestellt.

Reinigungsmittel	Ausgangsmaterial	Fz	1. Elut. Fz	2. Elut. Fz	3. Elut. Fz
I. Tonerde und Phosphat	Auszug	0.1911	4.46	8.27	
II. Tonerde und Phosphat	Tr. Präparat	2.56	10.75	16.36	
III. Tonerde, Bleiacetat u. Phosphat	Auszug	0.1911	4.46	14.25	24.16

Sie werden graphisch folgend gezeigt :



Die Analyse der reinsten Präparate ergab einen Proteingehalt von 69.89 % und einen Kohlehydratgehalt von 26.94% der phosphorsalzfreien Substanz. Gegenüber dem Ausgangsmaterial hatte der Stickstoffgehalt stark zu-, der Kohlehydratgehalt stark abgenommen. Das Ergebnis stimmt gut mit den Analysenwerten von Lüers und Sellner an der Malzamyase überein.

Die reinsten Präparate zeigen deutlich alle Färbungsreaktionen des Eiweisses.

Ein bestimmter Eiweisskörper scheint also zum Enzym in näherer Beziehung zu stehen. Wie schon oben erwähnt, soll damit keineswegs behauptet

werden, dass die Amylase selbst ein Protein sei. Weitere endgültige Versuche müssen hier erst Klarheit bringen.

Um meinen besten wert von  $F_z=26$  mit dem von Takamine dargestellten Präparate, das 43 (bei  $21^\circ\text{C}.$ ) Lintner-Einheiten hatte, vergleichen zu können, und ihn gleichzeitig in einem bekannten Masse verständlich zu machen, rechne ich ihn auf die von Lintner eingeführte Wertung um. Nach Lintner wird die diastatische Kraft ausgedrückt durch die Menge Maltose, welche von 100 g. Enzym-Trockensubstanz in 30 Minuten bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}.$  gebildet wird.

0.000568g. meines Präparates lieferte in 30 Minuten bei  $20^\circ\text{C}.$  0.4025g. Maltose. 100g. des Präparates erzeugen folglich rund 71000g. Maltose, oder das Präparat hat eine diastatische Kraft von 71000 Lintner-Einheiten.

## STUDIES ON PROTEINS VI.

### THE INFLUENCE OF SALT ON THE POINT OF OPTIMUM FLOCCULATION OF RICE-GLUTELIN.

(Contribution No. 7 from the Laboratory of Nutritional Chemistry,  
Dept. of Agriculture, Kyoto Imperial University)

By

Kinsuke KONDO, Tunesomo HAYASHI and Takashi MATSUSHITA.

(Received Oct., 1st., 1926.)

**A.** The point of optimum flocculation of the rice-glutelin is dependent upon the salt in the solution. We attributed this cause to the difference of the protein-ionizing forces of ions derived from the salt. We examined as to whether our theory holds good for  $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  and  $\text{LiCl}$  or not. The proteins, used in the present work, are rice-glutelin No. 1 and No. 2.

**B.** The 5c.c. of the concentrated sodium rice-glutelinate solution is mixed with an acetate acetic acid solution in such a manner as to insure that the concentration of sodium acetate be constant and that of acetic acid be variable in the solution. The rice-glutelin flocculates out in various quantity. These results show us that in the range of 0.05—0.3n the higher the concentration of sodium acetate in the solution become, the farther the point of optimum flocculation or apparent iso-electric point of this rice-glutelin goes to the acidic side, and it is variable in proportion to the salt concentration. This is not identical with the results of Michaelis,<sup>(1)</sup> and the optimum flocculation does

(1) Michaelis, *Biochem. Zt.* **103**, 178 (1920).



not mean the complete flocculation.

But the maximum amount of the flocculated rice-glutelin is not changeable in all the experiments, in the range of experimental error.

Therefore we may conclude that the amount of maximum precipitation of this protein is independent of the concentration of the sodium acetate.

But the amount of the precipitated protein is less than the entire amount in the solution. In other words the optimum flocculation does not mean the complete flocculation and a part of this protein is dissolved in the solution after optimum flocculation.

We examined also the behavior of the rice-glutelin in the solution containing another salt mixed with sodium acetate and cast one glance the influences of NaCl, KCl and LiCl on the flocculation of this protein.

According to the results we see that up to the point when the concentration of the used salt increases to 0.5*n*, the higher the concentration of the salts becomes, the less the amounts of precipitated rice-glutelin.

But if the salt concentration increases to more than 0.5*n*, the amount of flocculated protein again increases. And in the 0.1*n* sodium acetate solution containing 0.01*n* of the chloride the rice-glutelin can flocculate at its greatest and more than in the acetate solution, free from the other salt. But even in such a solution the rice-glutelin can not flocculate completely.

**C.** We have elucidated these phenomena by showing the difference among the protein-ionizing forces of ions derived from the salts. These forces are peculiar to the kind of salt and its concentration and the nature of the protein. Therefore the apparent iso-electric reaction of a protein difficult of solution is variable according to the salt used and its concentration.

---

## STUDIES ON PROTEINS VII.

### ON THE REFRACTIVE INDICES OF PROTEIN SOLUTION PART I.

(Contribution No. 8 from the Laboratory of Nutritional Chemistry,  
Dept. of Agriculture, Kyoto Imperial University).

By Kinsuke KONDO and Tunetomo HAYASHI.

(Received Oct. 1st., 1926.)

**A.** Robertson<sup>(1)</sup> determined the refractive indices of the protein solution

---

(1) T. B. Robertson:— Jour. Phys. Chem., **13**, 469 (1909).

The other results are summarized in his book; Phys. Chem. of Proteins 1918.

with the aim of determining more accurately the amount of protein in the solution. Thereupon he proved that refractive indices of the protein solution run accurately with the concentration of protein according to the following formula :

$$n - n_1 = a \times c$$

" $n$ " and " $n_1$ " represent the refractive indices of the solution and solute respectively ; " $c$ " is the protein concentration in the solution (number of gms. of protein in 100 cc.) and " $a$ " is the special constant for the protein.

After Robertson, the change of refractive indices of the aqueous solution after dissolving of the protein is a function of the space, which is occupied by the protein molecule. And the molecular volume is the additive function of the atomic volume. Hence the molecular refraction is the additive function of the atomic refraction. The protein molecule is an associated substance of a number of atoms, and the volume of protein is almost inchangeable altho a few atoms of protein are substituted for other atoms or any atoms or any atom or atom group may be added to the protein molecule. Therefore the change of the refractive indices of the aqueous solution by the dissolution of the protein is independent of the nature of acid or alkali which may combine with protein or their combining proportion, because the molecular refraction is the additive function of the atomic refraction.

Our present knowledge in this field however teaches us that the atomic refraction is dependent upon the valency, the position in the molecule and the iogenic condition of the atom. Possessing this knowledge we may easily suppose that the molecular refraction is changeable according to the chemical and physical condition of the molecule and ints constituents, i. e., the atoms, because, as we say, the molecular refraction is the additive function of the atomic refraction.

That is, the refractive indices of the solution are the function of the molecular volume of the solute as well as that of its construction and its condition. Moreover, we may consider that the protein is accompanied by an intermolecular change in its molecule on the opposite sides of its iso-electric point.<sup>(2)</sup> Notwithstanding this change, will the refractive indices of the aqueous protein solution be independent of the nature of acids or alkali which combine with protein and their combining proportion? Robertson also adds that his theory can only hold good for the special solvent, i. e., the diluted aqueous solution of acids or alkali. Thus, for example, his theory can not hold good for an alcoholic protein solution.

Now the refractive indices of the solution are not only dependent upon the nature and wave length of the physical condition of the solvent and solute,

(2) J. Loeb :- Protein and the Theory of Colloidal Behavior, p. 33 (1922)



accompanied by the change of the latter's concentration, but the problem will become more complicated and complex if we take into consideration the consumptive absorption of light and conservative smothering of the solution. It is, therefore, not to be wondered at that the great studies in this field could not be governed throuout by theory, even tho the work was concerned with a real solution or a colloidal solution.

### B. a. On Rice-glutelin.

Rice-glutelin No. 2 is used for the present work. The sodium rice-glutelinate solution is prepared in such a manner as that the concentration of sodium hydroxide become 0.02n and the amount of the protein nitrogen is 4.0199g in 1L. of the solution.

With this solution and its diluted solution the refractive angle is under a Na-light, observed, by means of Pulfrich's refractometer which keeps the observed solution at  $18^{\circ} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . with a current of hot water in its pipe. The results are tabulated as follows.

Table 1.  
Sodium Rice-glutelinate

a g. of Rice-glute- lin-N in 1 L. of Solution	b g. Equivalent of Rice-glutelin-N	n Refractivity	v	$\mu$ $\frac{n-n_w}{b} \times 10^3$	$\alpha$ $\frac{\mu}{\mu_{\infty}}$	pH
4.0199	0.2869	1.33732	3.4855	15.999	83.33	11.010
2.0100	0.1434	1.33501	6.9735	15.900	82.81	11.098
1.0050	0.0717	1.33391	13.9470	16.457	85.71	10.910
0.5025	0.0358	1.33333	27.9320	16.750	87.29	10.662
0.2513	0.0179	1.33304	55.8640	17.318	90.20	10.462

In the table "a" and "b" represent the number of grams and g-equivalent of rice-glutelin-nitrogen in 1L. of the solution respectively. "n" and " $n_w$ " are the refractive indices of the solution and water.

"V" represents the number of liters which contain a g-equivalent of the protein nitrogen.  $\mu = \frac{n-n_w}{b}$  is the refractivity of the solution which contains one g-equivalent of rice-glutelin in 1L. of the solution and we call this the nitrogenequivalent refractivity of the protein.

If we take the nitrogen-equivalent refractivity as ordinate and  $\frac{1}{V}$  as abscissa, we can trace the  $\mu - V$  curve as in the following figure.

" $\alpha$ " represents the value of  $\frac{\mu}{\mu_{\infty}}$ , in which  $\mu_{\infty}$  is estimated after the figure and is called the nitrogen-equivalent refractivity at an indefinite dilution.

Observing the above table, it comes to our mind that the action of the rice-glutelinate as well as that of the alkali-caseinate resemble a typical neu-

$\mu$ -V curve for Rice-glutelin No.2.

$$\mu_{\infty} = 19.2 \times 10^{-3}$$

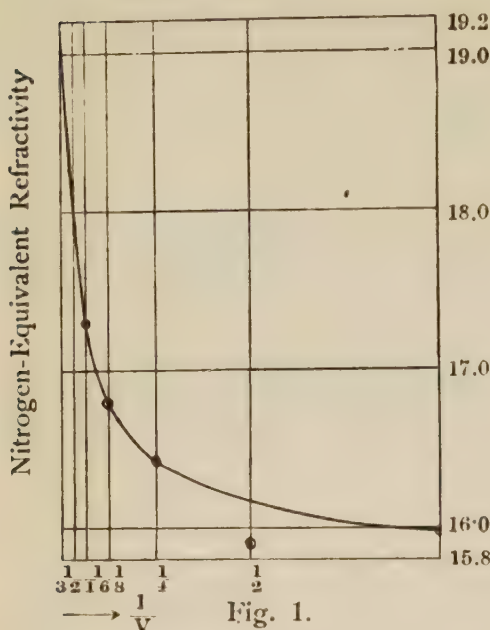


Fig. 1.

tral salt because the value of  $\mu_{\text{all}}$  rises slowly with increasing dilution.

Therefore we might better consider that  $\alpha$  represents the degree of dissociation of rice-glutelin than that it shows only the change of the refractivity of the rice-glutelin solution with its dilution.

#### B. b. On Casein.

We can see the same phenomena with casein as well as with rice-glutelin. The casein (Kahlbaum) is treated as we treated the riceglutelin and the sodium caseinate solution contains 7.2682g of casein-nitrogen in 1L. of the solution. The refractivity of this solution are observed under a Na-light at 18°C. The results are summarized in Table 2.

Table 2  
Sodium caseinate

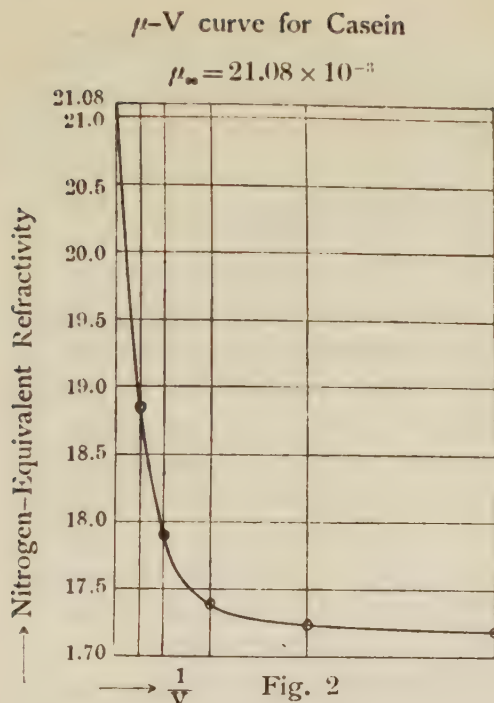
a g. of Casein-N in 1L. of Solution	b g. equivalent of Casein-nitrogen	n Refractivity	V	$\mu$ $\frac{n - n_w}{b} \times 10^3$	$\alpha$ $\frac{\mu}{\mu_{\infty}}$	$\mu_{\text{all}}$
7.2682	0.5188	1.34167	1.9275	17.232	81.75	6.378
3.6341	0.2594	1.33721	3.8550	17.271	81.93	6.480
1.8170	0.1297	1.33499	7.7101	17.425	82.66	6.688
0.9085	0.0648	1.33389	15.4202	17.901	84.92	6.766
0.4543	0.0324	1.33334	30.8404	18.827	89.31	7.024

All signs in Table 2 means the same as in Table 1. The  $\mu$ -V curve for the sodium caseinate is figured in the same way as in the figure. By means of this figuration the value of  $\mu_{\infty}$  is extrapolated and then  $\alpha$  is calculated as in the table.

C. Our results with either rice-glutelin or casein are not in accordance with Robertson's formula, etc.<sup>(3)</sup> That is, the refractive indices of the protein

(3) Walpole, G. S.: Koll. Zt., 13, 241 (1913) Wington, R.: Koll. Beih., 7, 251 (1915)  
Wirgner, G.: Koll. Zt., 20, 7 (1917)





aqueous solution is not accurately proportional to the concentration of protein. After Robertson's theory, the protein molecule has a certain specific refraction in an aqueous solution, which is independent of the protein concentration. (The diluted acid or alkali solution)

We, however, believe that the protein salt dissociates in an aqueous solution, and the degree of the dissociation is dependent upon the protein concentration as in the case of typical salt, and further more the ionized molecule has a different refractive power from the non-ionized one.<sup>(4)</sup> Accordingly the refractivity of the protein in aqueous solution is changeable according to the protein concentration.

If this supposition holds good for our case, it is, of course, natural that our experimental results could not be governed by Robertson's formula.

Under the above supposition, we can elucidate the change of refractivity of the protein aqueous solution by the ion theory of the protein molecule and can confirm with certainty that an ionized protein has not the same refractive power as that of a non-ionized one. Therefore, the determination of the Nitrogen Equivalent-Refractivity of the protein is able to show us the degree of dissociation of the protein salt.

After this principle we can say conclusively that sodium rice-glutelinate can dissociate highly as well as sodium caseinate more than about 80 per cent.

If we expand our theory on the refractivity of the protein solution, it will result in the conclusion that to an ampholyte such as protein belong different nitrogen-equivalent refractivities according as the protein behavior is that of a cation or an anion.

(4) Le Blanc:— Zt. Physik. Chem. 4, 553 (1889) Ibid, 19, 261 (1896)

# STUDIES ON THE DIGESTION OF FOODS. (PART I)

## ON THE ETHER EXTRACT OF EXCRETORY FROM DIGESTIVE ORGANS.

By Shigeo SUZUKI and Tetsuo MUROTA.

We have attempted to find out the amounts of nitrogen compounds, ether extracts, and crude ash, which, on determining a digestive coefficient of foods and feeding stuffs by animal experiment, comes to mix in the feces from the digestive organs, and to creat a new basis for the calculation of a true digestion coefficient, which can replace the old, mere external coefficient. So two dogs were fed with the fat free rice powder, horse meat powder and common salts, added with some fiber, for we thought that the excretory products of digestive organs must vary according to the digestion coefficient of every food. To this purpose the filter paper was destroyed to fiber by water.

Each period, our experiment was done, consists of ten days, and we determined the difference of the ether extract in feces, which is considered to come from the digestive organs by each different coefficient.

The following figures are its results.

Fiber in the food.	Digestion coefficient of dry matter.	Total ether extract in the feces.	Ether extract in the feces- dry matter.
	%	gr.	%
A—dog, non fiber	97.241	3.851	7.109
B—, " "	97.281	3.764	7.051
A, B—, " " (av.)	97.261	3.808	7.080
B—, 0.5% "	96.614	4.654	6.966
A—, 1" "	95.879	4.259	5.265
B—, 1" "	96.053	4.191	5.354
A, B—, 1" " (av.)	95.966	4.225	5.310
B—, 2" "	94.981	3.974	3.953
A—, 3" "	93.841	3.927	3.152
B—, 3" "	93.827	3.921	3.141
A, B—, 3" " (av.)	93.834	3.924	3.147
B—, 4" "	92.907	3.885	2.682
A—, 5" "	91.700	3.817	2.230
A—, 7" "	89.865	3.260	1.531
A—, 10" "	87.383	2.349	0.861

(1) The amount of the ether extract which mixes in the feces is different with the variation of the digestion coefficient. Generally the less the fiber in food is, the more the amount of excretory products and the



percentage of the ether extract in the dry matter of the feces is.

(2) The percentage of the ether extracts in the dry matter of feces decreases with the decline of the digestion, and its curve are regular. Therefore, when we know a digestion coefficient of total dry matter which was eaten, it is easy to see the quantity of the ether extract comes from the digestive organs, and from this we can calculate a true digestion coefficient of fat.

(3) On the digestion the effect of the increasing amount of fiber in food is not large, but in case of the crude protein and crude ash, it is larger than in case of the starch. And yet this is not always reliable, for it is a mere external digestion coefficient, in which the mixture from the organ is neglected.

Concerning the mixture of the crude protein and crude ash, we are now in the course of research.

## ON THE FERMENTATION PRODUCTS OF GLUCOSE BY *Oidium Lupuli*.

By Yusuke SUMIKI.

(Agricultural chemical laboratory, Tokyo Imperial University).

*Oidium Lupuli* Mathews et Lott is a fungus which occurs in wet hops or in "Hatchomiso-koji".

Up to the present, several investigations on *Oidium Lupuli* have been reported by Lindner (Woch. f. Brauerei, II, 1312, 1894), G. Kita (Deut. Ess. Indust., Dec., 1913), T. Akagi, I. Nakajima, K. Tsugane (J. Coll. Agr. Imp. Uni. Tokyo, 5, 263, 1915) and Y. Nishiwaki (Jōzōzâshi, 434, 17, 1911; Centbl. f. Bakt., Abt. II, 63, 25, 1924).

### I. Condition of culture.

*Oidium lupuli* was cultured at 30°C for 20—37 days in 39L of the following medium.

Glucose	10.00 g.
Peptone	0.10 g.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.015g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.015g.
MgSO <sub>4</sub>	0.010g.
CaCl <sub>2</sub>	0.010g.

FeCl<sub>3</sub>, NaCl... .. trace.  
Dist. water ... .. 100ccm.

The amount of glucose consumed was estimated by Bertrand's method at several intervals.

Days after inoculation.	Glucose consumed in 100ccm. of medium.
16	4.75 g.
23	5.95 g.
30	6.98 g.
37	7.73 g.

## II. Isolation and identification of fermentation products.

By steam distillation, volatile substances in the medium are isolated from non-volatile substances [residue (A), distillate (B)]. The distillate is added with the excess of barium carbonate and boiled. After cooling and filtering, the filtrate is distilled for the isolation of alcohol and aldehyde from barium salt of volatile acid [residue (C), distillate (D)].

### (1) Ethyl alcohol.

A fraction, b. p. 78°C, is obtained from the distillate (B) by repeating fractional distillation. This fraction, on treatment with the theoretical quantity of phenyl isocyanate, yields phenyl urethane, white long needle, m. p. 52°C.

0.0853g. subst. gave 6.15cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (15.5°, 762.4mm.)

Calculated for C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>N N 8.49%.

Found N 8.56%.

### (2) Acetaldehyde.

A fraction is obtained by repeating fractional distillation from the distillate (B) which gives the reaction of aldehyde with Schiff's reagent. This fraction also gives the following colour reactions (see author's report, Bull. Agr. Chem. Soc. Jap., 2, 24, 1926).

(a) Reaction of Windish.

(b) Reaction of Jeau.

(c) Reaction of Pittarelli.

(d) Reduction of ammoniacal silver nitrate solution.

By the addition of dimedon, this fraction acetaldimedon, m. p. 137—8°C. The m. p. of mixture with pure acetaldimedon shows no depression.

### (3) Succinic acid.

The residue (A) is concentrated under diminished pressure, is acidulated with phosphoric acid and extracted with ether. After removing ether and recrystallising from hot water, succinic acid, m. p. 184°C, is obtained.

0.1080g. subst. gave 0.1602g. CO<sub>2</sub> and 0.0512g. H<sub>2</sub>O

Calculated for C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> C 40.67% H 5.08%.

Found C 40.45% H 5.26%.



## (4) Acetic acid.

The residue (C) is evaporated to dryness, added with phosphoric acid to set volatile acid free and distilled. The distillate, on treatment with yellow mercuric oxide, gives white mercuric acetate.

0.0620g. subst. gave 0.0452g.  $\text{SHg}$ .

Calculated for  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Hg}$   $\text{Hg}$  62.96%.

Found  $\text{Hg}$  62.84%.

## III. Quantitative determination of fermentation products.

The four substances above described were identified as the fermentation products, but the latter three were produced in so small amounts that I determined quantitatively only ethyl alcohol by the ordinary distillation method.

The conditions of culture are all the same as mentioned above (see I) except the quantity of peptone, the source of nitrogen, which is indicated by the following table.

	Quantity of peptone in 100ccm of medium.	Glucose : Peptone.	Maximum yield.	Days after inoculation.	Wt. of fungus.
1.	0.1g.	100 : 1	3.00vol%	31	0.11g.
2.	0.5g.	100 : 5	4.29 "	19	0.26g.
3.	1.0g.	100 : 10	4.18 "	16	0.36g.
4.	3.0g.	100 : 30	1.82 "	14	0.57g.
5.	5.0g.	100 : 50	1.20 "	12	0.58g.

## IV. Conclusion.

It has been found that ethyl alcohol is the greater part of fermentation products from glucose and also a small amount of succinic acid, slight quantities of acetic acid and acetaldehyde are produced along with ethyl alcohol. 3.40g. of ethyl alcohol is the maximum yield from 10g. of glucose when the ratio of glucose to peptone is about 20 to 1.

## ON THE DIFFERENCES OF THE BREWING BARLEY ACCORDING TO SPECIES.

### I. THE INVESTIGATIONS OF THE PROTEINS.

By YUKIHIKO NAKAMURA.

(Received Dec. 10th., 1926.)

#### Introduction.

The use of barley in Japan is very wide, not only as food for man, and

farm animals, but also for the brewing of beer. The amount of its consumption especially for the brewer's purpose, with the improvement of the fermentation industry, increases year after year. Consequently, barley is now ranking among the more important products in our agricultural world. From statistics, it can be seen that the production of barley in this country is about 8,800,000 Koku valued at 10,000,000 Yen per annum and from the standpoint of the technical industry, the amount of the consumption of barley for brewing is the largest. The import of malt is disproportionately larger than the import of barley, indicating that there must be some differences in the barley and the malt produced at home and abroad. The very large amount of consumption of barley for brewing purposes tells us how a study of the barley might be useful for the brewing. Recently some authors were able to find out the physico-chemical specificities of oryzenins according to the varieties of the rice. The present investigation is aimed to find out, if any, marked specificities in the proteins of the barley.

Investigations upon barley which have hitherto been carried out and are already numerous, can be classified into 9 parts; (1) upon the method of the estimation, (2) upon the nutrition and the nutritive value, (3) upon the relations among the soil, the manure and the growth of the plant, (4) upon the relations between the growing period and the constituents of the plant, (5) upon the fermentation, (6) upon the starches, (7) upon the fats, (8) upon the proteins and (9) upon the enzymes.

But concerning the protein and the fermentation of the barley, almost all the investigations are limited to the determinations of the hydrolyses products of the proteins, or the results of feeding experiments with the proteins. The effects of the species of the barley upon the proteins or the differences of the proteins derived from the different species of the barley are not yet studied. If the problem could be made clear and the effects of the different species of the barley were known, it would tell us another way and direction of agricultural planning.

### Conclusions.

The barley widely used among the brewer in this country are Golden Melon, Chevalier and Hokudai No. 1, so the present investigation was carried out with these 3 species of barley. The results of the present physico-chemical and chemical investigations of the proteins obtained from these 3 species of barley, using the yield of three successive years, are as follows:—

(1) Using 1,000 kernels each, no regular relationship could be found among the characters of the three species of barley, so far as they concern weight and specific gravity of the barley grains.



(2) On the chemical analyses of the powder of the grains, the total nitrogen and the protein nitrogen content are the least in Golden Melon, and the most in Chevalier with Hokudai No. 1 lying between the two.

(3) The isolation and determination of four kinds of nitrogen of these three species always shows the smallest amount of nitrogen soluble in 10 % NaCl solution and the amount increases according to the order of the water soluble, the 70 % alcohol solution soluble and the 0.2 % NaOH solution soluble nitrogen.

The quantities of 10 % NaCl solution soluble nitrogen decrease in the order Golden Melon, Hokudai No. 1 and Chevalier. The 0.2 % NaOH solution soluble nitrogen decreases in the order Hokudai No. 1, Golden Melon and Chevalier.

(4) The ash content of the proteins increases in the order, hordein, 10 % NaCl solution soluble protein and glutenin. As for the species of the barley, Golden Melon has the minimum ash content, Chevalier medium, and Hokudai No. 1 the maximum. This appears to be a constant relation found among the species of the barley and among the kinds of the proteins.

(5) Among the species of the barley, there is a tendency that the content of carbon and hydrogen of the protein always follow and that of oxygen is always contrary. The content of the nitrogen of the protein is markedly different among the species of the barley. That of the 10% NaCl solution soluble protein and the glutenin is the maximum in Hokudai No. 1, medium in Chevalier and the minimum in Golden Melon while that of the hordein is maximum in Golden Melon, medium in Chevalier and minimum in Hokudai No. 1. The content of the nitrogen of the hordein is the smallest, the glutenin medium and the 10 % NaCl solution soluble protein the maximum.

The sulphur content of the proteins is not regular, but it can be seen that of the hordein is the highest and the glutenin the lowest.

(6) The amount of free amino nitrogen of the 10 % NaCl solution soluble protein is the greatest in Golden, medium in Hokudai No. 1 and the smallest in Chevalier, and that of the glutenin, the greatest in Chevalier, medium in Golden Melon and the smallest in Hokudai No. 1. The amount of free amino nitrogen of the hordein is always greater in Chevalier than in Hokudai No. 1, and in Golden Melon it is irregular. The hordein contains less free amino nitrogen than the 10 % NaCl solution soluble protein and the glutenin, while the 10 % NaCl solution soluble protein seem to contain more than the glutenin.

(7) Differences are observed among the content of the hydrolytic products of the 10 % NaCl solution soluble protein, of the hordein and of

the glutenin according to the species of the barley.

(8) The changes of the turbidity and the surface tension of the protein in an alkaline solution when titrated with HCl are observed. In the case of the water soluble protein, the maximum quantity of HCl in order to attain greatest surface tension and turbidity is required by Golden Melon, and in the case of the 10 % NaCl solution soluble protein, the required quantities of HCl are decreased in the order Hokudai No. 1, Chevalier and Golden Melon. In the case of the hordein, that of Golden Melon requires the maximum amount of HCl, next Hokudai No. 1 and Chevalier requires the minimum amount. Using glutenin, the quantities of HCl required decrease in order Hokudai No. 1, Golden Melon and Chevalier.

(9) From the results of the preceding experiments, i. e. the changes of the turbidity and the surface tension and the results of the determination of free amino nitrogen, it can be deduced that the  $P_H$  value of the isoelectric point of the water soluble protein is the lowest in Golden Melon, that of the 10% NaCl solution soluble protein decreases in the order Golden Melon, Chevalier and Hokudai No. 1, that of the hordein decreases Chevalier, Hokudai No. 1 and Golden Melon, while that of the glutenin decreases Chevalier, Golden Melon and Hokudai No. 1.

(10) The specific rotatory power of the water soluble protein in an alkaline solution is the largest in Golden Melon, that of the 10 % NaCl solution soluble protein alkali solution decreases in the order Golden Melon, Chevalier and Hokudai No. 1, and that of the hordein in an alkaline solution decreases in the order Chevalier, Hokudai No. 1 and Golden Melon.

## QUINOLINE AND ACRIDINE SYNTHESIS.

By Konomu MATSUMURA.

(Received Oct 2nd., 1926.)

### I. 7-Iodo-5-amido-8-hydroxy-quinoline.

7-Iodo-5-nitro-8-hydroxy-quinoline (I) was obtained by iodination of 5-nitro-8-hydroxy-quinoline. Orange needles. F. 249° (decomp.)

7-Iodo-5-amido-8-hydroxy-quinoline was obtained by reducing (I) with  $\text{SnCl}_2$  and conc. HCl. Light yellowish needles. It softens at ca. 147° and melts at 157°. Picrate: reddish brown needles, F. 159° (decomp.).



## II. 5-Iodo-8-hydroxy-quinoline.

A dilute aqueous solution of the sodium salt of 8-hydroxy-quinoline was treated with an aqueous solution of a molecular quantity of indine and the same quantity of KI at room temperature. The product was found to be a mixture of 5-Iodo-8-hydroxy-quinoline (I)



and 5-7-di-iodo-8-hydroxy-quinoline (II).

(I) was separated from (II) by its easier solubility in ethyl alcohol than the latter.

(I) was crystallised from alcohol into colourless prisms.

F. 127—8°. Methiodide: brown needles with metallic luster. F. 142°. Readily soluble in hot alcohol, scarcely in hot water, and insoluble in ether.

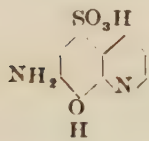
## III. 7-Amido-8-hydroxy-quinoline and its related compounds.

8-Hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid (I) was prepared by the Claus's method (J. pr. [2] 41, 33). F. 322—3°.

7-Benzen-azo-8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid (II) was obtained by coupling (I) with diazo-benzene-chloride.

Long needles of dark red colour, darkening at 268° and melting at 310°. Mono Na-Salt: orange needles, fairly soluble in water.

7-Amido-8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid (III)



was obtained by reducing (II) with  $\text{SnCl}_2$  and  $\text{HCl}$  by the Witt's method (B. 21, 3472). Bright orange needles from hot dil.  $\text{HCl}$ . It does not melt at 310°. It loses its crystall water (1. Mol.) on drying at 110° and takes a more reddish colour.

7-Acetamido-8-hydroxy quinoline-5-sulfonic acid. F. 277° (decomp.).

7-*p*-Nitro-benzoyl-amido-8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid. F. 297° (decomp.).

7-8-Di-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid was obtained by the diazotisation of (III) and the following decomposition of the diazo compound in warm conc. sulphuric acid.

Yellow needles. F. 302° (decomp.).

7-Amido-8-hydroxy-quinoline was obtained by heating (III) with dil.  $\text{HCl}$  for six hours at 170°. Slightly coloured prisms. It begins to decompose at 117° and melts at 124°. Hydrochloride: needles. F. 256°.

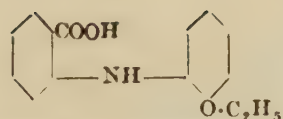
Picrate: reddish brown prisms. F. 205° (decomp.).

7-Acetamido-8-hydroxy-quinoline: colourless needles. F. 177°.

7-Acetamido-8-hydroxy-quinoline-methiodide: yellow needles. F. 195°.

## IV. 3-Iodo-4-hydroxy-acridine-1-sulfonic acid.

6'-Ethoxy-diphenylamine-2-carbonic acid (I)



was obtained by condensing *o*-Cl-benzoic acid with *o*-phenetidine. Light yellow needles. F. 160–1.°

4-Ethoxy-(II) and 4-Hydroxy-(III) acridones were obtained by warming the solution of (I) in conc. sulphuric acid for a quarter of an hour on a water bath. The separation of (II) from (III) was effected by the subsequent treatment of the product with dil. NaOH solution.

(II): yellow needles. F. 320° (decomp.). (III): yellow needles. F. 300°.

4-Ethoxy-acridine was obtained by reducing (II) in amyl alcohol with Na. Yellow needles. F. 80°.

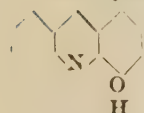
Hydrochloride: yellow needles. F. 220° (decomp.)

Sulphate: yellow needles. F. 250°.

Picrate: yellow needles. F. 255°.

Methyl sulphate: Orange yellow hygroscopic needles. F. 189°.

4-Hydroxy-acridine (IV)



was obtained by reducing (III) in amyl alcohol with Na.

Spindle shaped crystals. F. 117°. Hydrochloride: orange

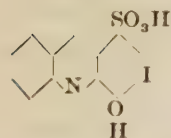
needles. F. 252° (decomp.). Sulphate: orange needles. F. 240°.

Picrate: orange needles. F. 215°.

4-Hydroxy-acridine-1-sulfonic acid (V) was obtained by treating (IV) with fuming sulphuric acid (5%) at 8°.

Yellow columns. F. 301° (decomp.).

3-Iodo-4-hydroxy-acridine-1-sulfonic acid



was obtained by iodination of (V) with nascent iodine.

Yellow needles. Evolve iodic fumes at 240° and melt at 264° under decomposition.

Besides those mentioned above, several other quinoline derivatives were also synthesised and their physiological effects have been studied by Drs. Hata and Hachiya. The following table denotes their germicidal power for Streptococci in vitro.

Substance.	Dilution with Serum bouillon.
Pyridine ... ..	80
Phenol ... ..	100
Quinoline ... ..	700
8-Hydroxy-quinoline ... ..	500,000
6-Hydroxy-quinoline ... ..	1,500
8-Ethoxy-quinoline ... ..	600
8-Hydroxy-quinoline-methiodide ... ..	5,400
8-Ethoxy-quinoline-methiodide ... ..	1,800
8-Hydroxy-quinoline-methyl-sulphate ... ..	900
8-Hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid ... ..	50
7-8-Dihydroxy-quinoline-5-sulfonic acid ... ..	200
7-Iodo-8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid ... ..	100

7-Amido-8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid	1,800
7-Amido-quinoline	<50
7-Acetamido-quinoline	<50
7-Amido-8-hydroxy-quinoline	48,000
5-Amido-8-hydroxy-quinoline	48,000
7-Acetamido-8-hydroxy-quinoline	48,000
5-7-Diamido-8-hydroxy-quinoline	<600
7-Acetamido-8-hydroxy-quinoline-methiodide	13,500
7-Iodo-5-amido-8-hydroxy-quinoline	5,400
Quinoline-cerium chloride	80?
5-Cl-8-hydroxy-quinoline	100,000
5-Iodo-8-hydroxy-quinoline	100,000
5-7-Di-chloro-8-hydroxy-quinoline	100,000
5-7-Di-iodo-8-hydroxy-quinoline	3,000
5-chloro-7-iodo-8-hydroxy-quinoline	1,500
1-Hydroxy-acridine	750?
4-Ethoxy-acridine	750
3-Iodo-4-hydroxy-acridine-1-sulfonic acid	500

## EINE MIKROQUANTITATIVE STICKSTOFFANALYSE IN BODEN.

Von Muncari TANAKA.

(Aus d. Landwirt. Chem. Institut d. Universität Kyoto.)

(Eingegangen am 10. Okt. 1926.)

Bei der Bestimmung der hauptsächlichen Pflanzennährstoffe im Boden muss man erwägen, dass die hier ausschlaggebenden Mengen meist ausserordentlich gering sind, und dass somit meist die höchsten Anforderungen an die Genauigkeit der chemischen Analyse gestellt werden müssen. Wenn man so z. B. eine Düngung von 7.5 kg. Stickstoff in 75000 kg. Boden geben würde, macht das 1 mg. in 10 gr. Boden. Will man die Analyse auf 1 % genau ausführen, so dürfte der Analysenfehler danach bei Anwendung von 1 gr. Boden  $\pm 0.000001$  N nicht überschreiten.

Mitscherlich<sup>(1)</sup> hat mit seinen Mitarbeitern eine quantitative Stickstoffanalyse nach geringen Mengen ausgearbeitet. Seine Methode besteht in einer Modifizierung des Kjeldahls. Nach den Angaben von Mitscherlich lässt sich der Stickstoff bei geringen Mengen noch auf  $\pm 0.000012$  gr. genau bestimmen, jedoch ist seine Methode wegen der vielen Reagenzien die man herstellen muss sehr kompliziert. Ich habe Dubsky's<sup>(2)</sup> Methode angewandt und



konnte dadurch  $\pm 0,00001$ gr. Gesamtstickstoff von Boden bestimmen, und zwar ist es ganz gleich ob dieser Stickstoff in Form von Ammoniak, Nitrat, Nitrit, oder in Form von organischem Stickstoff vorliegt. Die Methode ist folgende :

Zur Kontrolle habe ich zuerst einige bekannte organische Substanzen mit geglühtem Boden oder Kupferoxyd gemischt und verbrannt. Ich habe feststellen können, dass durch dieser Methode der technische Fehler niemals 1% vom enthaltenen Stickstoff überschreitet. z. B.

9.250mg. Brucin ergaben 0.611ccm. N ( $30^{\circ}$  756mm.) Gefunden 7.14%. Berechnet 7.12%. Demnach beträgt der Fehler nur  $\pm 0.02\%$ .

Feiner Boden wird bei  $110^{\circ}$  zum konstanten Gewicht getrocknet. Davon wurden ganz genau 0.1—0.5gr. Boden auf dem Schiffchen von 3cm. Länge abgewogen und vorsichtig in das Verbrennungsrohr eingeführt. (In diesem Falle kann man Pregl's<sup>(3)</sup> Methode nicht benützen, da sich zu viele Fehler in den Resultaten vorfinden.) Die Ausführung der Verbrennung ist etwas anders als bei der gewöhnlichen organischen Substanz. Die Stickstoffe in Boden sind meistens ziemlich schwer zu verbrennen. Nachdem die Luft voll kommen verdrängt ist, wird die reduzierte Spirale, Kupferoxydschicht und das Schiffchen weitere 10 Minuten, so dass innerhalb 20 Minuten der Stickstoff vollkommen ausgetrieben ist. Aus vielen Proben lasse ich hier nur einige Analysen, die nach dieser Methode ausgeführt worden sind folgen :

A) 428.40mg. Boden ergaben 0.344ccm. N ( $30^{\circ}$  755mm.) 0.0844% N Gefunden 441.40mg. desselben Bodens ergaben 0.348ccm. ( $30^{\circ}$  755m.) 0.0853% N Gefunden. Fehler  $\pm 0.0009\%$ .

B) 217.90mg. Boden ergaben 0.258ccm. N ( $30^{\circ}$  755mm.) 0.1279% N Gefunden 228.70mg. desselben Bodens ergaben 0.267ccm. N ( $30^{\circ}$  756mm.) 0.1265% N Gefunden. Fehler  $\pm 0.0014\%$ .

#### LITERATUR :

- 1) Alf. Mitscherlich und Paul Herz : Eine quantitative Stickstoffanalyse für sehr geringe Mengen. Landwirt. Jahrb. 1809 u. 1910.
- 2) J. V. Dubsky : Vereinfachte quantitative Mikroelementaranalyse organischer Substanzen. 1917.
- 3) Fritz Pregl : Die quantitative organische Mikroanalyse. 1923.

## INVESTIGATION ON THE BIILMANN'S QUINHYDRONE ELECTRODE. III.

By ARAO ITANO, Satiyo ARAKAWA and K. HOSODA.

*Department of Chemistry and Microbiology, Ohara Institute for Agricultural  
Research, Kurashiki, Okayama-Ken, Japan.*

(Received Oct. 27th., 1926.)

The results of the following investigations are reported :

1. Efficiency of the quinhydrone in determination of  $P_{H_2}$  and titration of various solutions which are commonly used in the soil microbiological investigations.

2. Use of an agar bridge and its study under different working conditions and treatment.

The following table gives the results obtained on the determination of  $P_{H_2}$  in the solutions, with different chain compared with the  $H_2$ -electrode :

TABLE I. Determination of  $P_{H_2}$ .

Solutions.	$P_{H_2}$ Determination by		
	$H_2$ -electrode	Q-C	Q-Q
A.	3.96	3.61	3.65
B.	6.71	7.01	7.04
C.	6.29	6.45	6.43
D.	7.55	7.22	7.19
E.	6.96	6.70	6.71
F.	7.85	7.64	7.70

Notes : A. Clark's buffer solution ; B. Soil solution ; C. Soil suspension ; D. Nutrient broth ; E. Medium for the Cellulose fermenter ; F. Ashby's solution (mannit).

The table indicates that the quinhydrone electrode gives slightly lower  $P_{H_2}$  except in the solution B. and in the suspension C. So far as our investigation is concerned, the quinhydrone electrode may be used satisfactorily in all these solutions.

Besides the determination of  $P_{H_2}$ , the titration was carried out on each solution by using NaOH and HCl. The results obtained are reported in detail accompanied with the graphs in the original paper.

The use of an agar bridge in forming the chain is questioned by some investigators, especially as to the repeated use of the same bridge. The results obtained by the authors show that the agar bridge can be used satisfactorily with very little difference. An old bridge can be used repeatedly

with due precautions such as through washing with the distilled water and kept in saturated KCl solution after each experiment.

## STUDIES ON THE CARBON-NITROGEN RATIO AND MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE SOIL IN RICE-FIELD.

By ARAO ITANO.\*

*Department of Chemistry and Microbiology, Ohara Institute for Agricultural  
Research, Kurashiki, Okayama-Ken, Japan.*

(Received Oct. 30th., 1926.)

This paper deals with the carbon-nitrogen ratio and microbiological analyses on the soil in rice-field. The experimental plots are located in a portion of the field which has been under cultivation for a few hundred years and the soil is the sandy loam, alluvial type<sup>(1)</sup>. Eleven small plots were used, and the soil in six representative plots were examined for their carbon<sup>(2)</sup> nitrogen<sup>(3)</sup> ratio and for the hydrogen ion concentration<sup>(4)</sup>, previous to the investigation, and the results are shown in the following table:

TABLE I.  
Carbon-Nitrogen Ratio and Hyhrogen Ion Concentration.

Plots.	C.	N.	C : N	P <sub>H</sub>
1.	1.671%	0.127%	13.2	6.71
3.	1.553	0.130	11.9	6.56
5.	1.556.	0.125	12.4	6.69
7.	1.558	0.123	12.7	7.19
9.	1.805	0.117	15.4	7.00
11.	1.304	0.112	11.6	6.88
Mean.	1.575	0.122	12.9	6.84

Each plot was treated differently with or without the addition of various combination of fertilizers which are commonly used on the farm, in this section of Japan. The carbon-nitrogen ratio of each component of the fertilizers is given in Table II.

---

\* The author was assisted by Satiyo Arakawa and Katsumi Hosoda.  
1, 2, 3, & 4. See the original paper.



TABLE II.

The Carbon-Nitrogen Ratio of Humus Forming Materials used.

Names.	C.	N.	C : N
Compost.	22.41%	1.77%	12.7
Soybean cake.	50.03	9.25	5.4
Cotton seed oil cake.	48.16	7.35	6.6
Genge.*	46.37	2.68	17.3
Straw (barley).	46.49	0.53	87.7
Red clover.	45.30	3.99	11.4

\* *Astragalus sinicus*.

The total carbon and nitrogen, added to each plot, were calculated, as shown in Table III.

TABLE III.

The Carbon-Nitrogen Ratio Provided to each Plot.

Plots.	Per cent supplied.		C : N
	C.	N.	
1.	—	—	13.2
2.	0.14	0.022	6.4
3.	2.13	0.024	88.8
4.	2.58	0.029	89.0
5.	3.61	0.041	88.0
6.	2.20	0.026	84.6
7.	2.65	0.036	73.6
8.	0.04	0.003	13.3
9.	0.11	0.009	12.2
10.	0.14	0.012	11.7
11.	—	—	11.6

The rice was planted on July 3, 1925 and harvested on November 2, 1925. The crop report for each plot was made according to the usual method. The results for the first year are given in the following table :

TABLE IV.

Amount of Crop Harvested in 1925.

Plots.	Rice in Hask. * (Kilogram per Tan.)	Straw. (Kilogram per Tan.)
1.	Not planted.	
2.	569.9	1143.9
3.	397.6	733.2
4.	386.1	714.0
5.	321.0	604.5
6.	439.3	832.1
7.	360.9	704.7
8.	477.5	834.9
9.	518.6	999.1

10.	523.5	1060.4
11.	455.2	853.7

\* Tan = 1/4 of an acre.

After the harvest, the second analyses of the soil in each plot were made for the total carbon and nitrogen, and the hydrogen ion concentration, and the results are given in Table V.

TABLE V.

Carbon-Nitrogen Ratio and Hydrogen Ion Concentration.

Plots.	C.	N.	C : N	P <sub>H</sub> .
1.	1.759%	0.240%	7.3	6.94
2.	1.780	0.266	6.7	6.82
3.	1.720	0.273	6.3	7.17
4.	1.678	0.273	6.1	7.11
5.	1.700	0.258	6.6	6.83
6.	1.614	0.238	6.8	6.81
7.	1.660	0.199	8.3	7.06
8.	1.669	0.190	8.8	7.04
9.	1.796	0.181	9.9	6.84
10.	1.559	0.154	10.8	7.08
11.	1.522	0.159	9.6	6.85

On examining the results given here in conjunction with those obtained in Table III, it is interesting to note that the C : N ratio became somewhat constant and lie between 6.1 and 10.8 although each plot was provided with a different ratio at the beginning. In all the plots except Plot 2 of which ratio increased slightly at the end, the ratio became much narrower.

### Summary.

From the results obtained thus far, it is premature to draw any conclusion since the investigation began only last year. However several noteworthy facts may be reported at this time :

1. In those plots which received the barley straw alone in various quantity, the amount of crop was inverse ratio to the amount of straw used.

2. The application of the compost and red clover, gave comparatively good crop.

3. It is difficult to find any definite correlation between the crop productivity and the C : N ratio at this time. But on the average, wider the ratio gave the better crop with exception of Plot 2.

4. The C : N ratio in all the plots became somewhat the same while at the beginning, the different ratio was provided.

The microbiological analyses on each plot are in progress in view to find some correlation with the chemical analyses and crop productivity.



## STUDIES ON THE BODY-FLUID OF THE SILK-WORM.

By S. BITO.

(Received Nov. 11th., 1926.)

The blood of the insect may be looked upon as the nutrient medium for the growth of the tissues of the body during larval life. It is a physiologically important thing to investigate the nature of the blood of the silk worm on sericulture.

The author has investigated the blood day by day at different stages of its development by chemical analysis customary for routine examination and others.

The summary of the experimental results may be given as follows.

1) The constituents of the blood of silk worms are changed according to its metamorphosis. It is probably owing to moulting, development of silk-gland and development of sexual organs.

2) There is an evident difference between the constituents of the blood of male and female. The female includes more organics than the male, and on the other hand the male has more inorganics than the female.

3) The blood of the silk worm produces the following colour reactions of protein: Biuret reaction, Millon's reaction, Adamkiewicz' reaction, Xanthoproteic reaction, and Ninhydrin reaction. Filtrate of alcohol-ether extract produces Salkowki's reaction. Filtrate free from protein does not reduce Fehling's reagent, but picric test is positive.

4) Two kinds of lipid, cholesterin and lecithin are contained in the blood of silk worms.

5) When the larva abstains from food, the blood concentrates in the first stage in hunger, and then the blood dilutes, and also when the larva is kept in a cold place the blood concentrates more than in the upper experiment.

6) Of the inorganics, phosphorus and magnesium are very high and kalium, sodium, calcium, silica and sulphuric acid are low. Traces of ferrous and manganese are found and manganese is higher in silk worms than in mammals. The larger parts of phosphorus are combined with organic compounds as lecithin or protein.

7) When the loss of blood is about 15 percent of the body weight, it has bad influence on the health and production of silk matter, which differs in different stages of development.

---



